

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



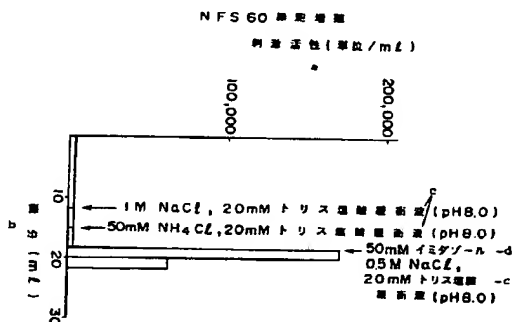
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 C07K 15/04, C12N 15/18 C12P 21/02, A61K 37/02		A1	(11) 国際公開番号 WO 93/03061
		(43) 国際公開日 1993年2月18日 (18.02.1993)	
(21) 国際出願番号 POT/JP92/00949 (22) 国際出願日 1992年7月24日 (24. 07. 92)		(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INCORPORATED) [JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo, (JP)	
(30) 優先権データ 特願平3/187470 1991年7月26日 (26. 07. 91) JP 特願平3/187481 1991年7月26日 (26. 07. 91) JP		(72) 発明者; および (73) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 小宮山淳 (KOMIYAMA, Atsushi) [JP/JP] 〒390-03 長野県松本市大字原31-11 Nagano, (JP) 中畑龍俊 (NAKAHATA, Tatsutoshi) [JP/JP] 〒390-03 長野県松本市大村352-1 Nagano, (JP) 久保徹夫 (KUBO, Tetsuo) [JP/JP] 〒390-03 長野県松本市岡田松岡271-1 メゾンアザレア203号 Nagano, (JP) 田中電平 (TANAKA, Ryuhei) [JP/JP] 〒514 三重県津市一心田平野767-48 Mie, (JP) 河野 源 (KAWANO, Genji) [JP/JP] 〒248 神奈川県鎌倉市津西2-3-13 東レ社宅D-1 Kanagawa, (JP)	
		(74) 代理人 弁理士 齊藤武彦, 外 (SAITO, Takehiko et al.) 〒107 東京都港区赤坂1丁目1番18号 赤坂大成ビル Tokyo, (JP)	
		(81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US.	
		添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title : HEMATOPOIETIC STEM CELL MULTIPLIER

(54) 発明の名称 造血幹細胞増加剤

- a ... Activity of stimulating NFS60 cell proliferation (unit: per ml)
- b ... Fraction (ml)
- c ... Tris-HCl buffer
- d ... imidazole



(57) Abstract

A hematopoietic stem cell multiplier containing at least one hepatocyte proliferating factor as an active ingredient. Because hepatocyte proliferating factors have an activity of proliferating undifferentiated pluripotent hematopoietic stem cells, they are useful as a hematopoietic stem cell multiplier not only in treating bone marrow inhibition and insufficiency but also in effecting in vitro growth of peripheral blood stem cells and bone marrow stem cells. Further it is possible to derive a hepatocyte proliferating factor from human normal fibroblasts among other hepatocyte proliferating factors by the gene recombination technique, and the obtained proliferating factor is, too, useful as a hematopoietic stem cell multiplier.

(57) 要約

肝細胞増殖因子類の少なくとも一つを有効成分とする造血幹細胞増加剤が提供される。肝細胞増殖因子類は、未分化の多能性造血幹細胞に対する増殖活性を有し、造血幹細胞増加剤として、骨髓抑制に対する治療、あるいは骨髓機能不全に対する治療に有用なほか、末梢血幹細胞および骨髓幹細胞の *in vitro* 増殖の用途に有用である。更に、遺伝子組換えの手法により肝細胞増殖因子類の一つと考えられるヒト正常線維芽細胞由来肝細胞増殖因子が得られ、それも造血幹細胞増加剤として有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FI	フィンランド	MR	モリタニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	MW	マラウイ
BB	バルバドス	GA	ガボン	NL	オランダ
BE	ベルギー	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	NZ	ニュージーランド
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	PT	ポルトガル
BR	ブラジル	IE	アイルランド	RO	ルーマニア
CA	カナダ	IT	イタリア	RU	ロシア連邦
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SD	スーダン
CG	コンゴ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CH	スイス	KR	大韓民国	SK	スロヴァキア共和国
CI	コート・ジボアール	LI	リヒテンシュタイン	SN	セネガル
CM	カメルーン	LK	スリランカ	SU	ソウイェト連邦
CS	チェコスロヴァキア	LU	ルクセンブルグ	TD	チャード
CZ	チェコ共和国	MC	モナコ	TG	トーゴ
DE	ドイツ	MG	マダガスカル	UA	ウクライナ
DK	デンマーク	ML	マリ	US	米国
ES	スペイン	MN	モンゴル		

造血幹細胞増加剤

技術分野

本発明は造血幹細胞増加剤に関するものである。特に
5 本発明は未分化の多能性造血幹細胞の増殖活性を有する
造血幹細胞増加剤に関する。本発明によれば抗癌剤使用
後や骨髄移植後の骨髄抑制を回復するための治療剤又は
再生不良性貧血や骨髄異形成症候群等の骨髄機能不全に
10 対する治療剤が提供される。さらに、この造血幹細胞増
加活性を有する造血因子は、末梢血幹細胞及び骨髄幹細胞
の *in vitro* での増殖剤等として使用して有用
な試薬となるほか、分析用の試薬や抗体作製の抗原と
しても有用である。

本発明は、さらに新規な造血幹細胞増加活性を有し、
15 肝細胞増殖因子類に属するタンパク質を提供することにも
関する。

背景技術

最近、未分化の多能性造血幹細胞から成熟血球に至る
20 分化の過程には、数多くの造血因子が種々のレベルで相
互に関与し、複雑な造血系ネットワークを形成している
ことが分かってきた。また、これら造血因子の殆どのもの
は遺伝子クローニングされ、現在、いくつかの造血因子
については遺伝子組換え技術により大量生産され、臨床
25 応用が進められている。一方、未分化の多能性造血幹
細胞は自己複製能（増殖）を有することを特徴としてい

1 るが、骨髄において未分化の多能性造血幹細胞に働く増殖因子については十分に解明されていない。

 骨髄における多能性造血幹細胞の増殖や成熟細胞への分化には骨髄ストローマ細胞が中心的な働きを果たしていることが知られており、ストローマ細胞が分泌する何
5 等かの液性因子あるいは細胞間相互作用等が骨髄における造血に関与していると考えられる。

 例えば、C 5 7 B 1 / 6 新生児マウスの頭蓋冠から樹立された骨髄ストローマ細胞 M C 3 T 3 - G 2 / P A -
10 6 (P A - 6) 細胞がマウスの多能性造血幹細胞の増殖を支持する事が知られている [K o d a m a H . e
 t . a l . : J . C e l l . P h y s i o l . , 1 1 2 , 8 9 (1 9 8 2)] 。

 近年、多能性幹細胞に発現しているチロシンキナーゼ
15 レセプターである c - k i t タンパク質に対するリガンドが未分化の幹細胞の増殖に関与する因子として注目され、その実体解明の研究が精力的に行われてきたが、1
 9 9 0 年に3つのグループがその遺伝子クローニングに成功し、SCF [s t e m c e l l f a c t o r ;
20 K . M . Z s e b o e t . a l . : C e l l , 6 3 , 1 9 5 - 2 0 1 (1 9 9 0)] 、 M G F [m a s t c
 e l l g r o w t h f a c t o r ; D . E . W i l l i a m s e t . a l . : C e l l , 6 3 , 1 6 7 -
 1 7 4 (1 9 9 0)] 、および K L [c - k i t l i
25 g a n d : ; H u a n g e t . a l . : C e l l , 6 3 , 2 2 5 - 2 3 3 (1 9 9 0)] として報告された。

1 現在、遺伝子組換え技術により大量生産された c - k
i t リガンドを使い、その作用の解析が進められている
が、これまでの研究ではこの因子はある程度分化した幹
細胞に作用する事がわかりつつある [H a y a s h i
5 e t . a l . : I n t . J . H e m a t o l o g y , S
u p p l . N o . 1 , p 1 9 8 (1 9 9 1)] 。

従って、このタンパク質の他に骨髄において、もっと
未分化の多能性造血幹細胞に働く因子が存在すると考え
られている。

10 この様な活性を有する造血因子は、抗癌剤使用後や骨
髄移植後の骨髄抑制を回復するための治療剤又は再生不
良性貧血や骨髄異形成症候群等の骨髄機能不全に対する
治療剤として、有用な医薬品となる。

15 さらに、この様な活性を有する造血因子は、末梢血幹
細胞及び骨髄幹細胞の i n v i t r o での増殖剤とし
て有用な試薬となるほか、分析用の試薬や抗体作製用の
抗原としても有用である。

発明の開示

20 本発明は肝細胞増殖因子類の少なくとも一つを有効成
分として含有する造血幹細胞増加剤を提供することを目
的とする。特に、本発明は未分化の多能性造血幹細胞
の増殖活性を有する造血幹細胞増加剤を提供することを
目的とする。この造血幹細胞増加剤は結果的には種々の
25 血液細胞ばかりでなく造血幹細胞の子孫である破骨細胞
の増殖も促進する。この造血幹細胞増加剤は肝細胞増殖

1 因子類の少なくとも一つに加えて、有効成分として更に
インターロイキン 3 及び／またはインターロイキン 7 を
含有するものであってよい。

5 本発明は更に、造血幹細胞増加活性を有し、肝細胞増
殖因子類に属する新規タンパク質を提供することをも目
的とする。特に、このようなタンパク質はヒト線維芽細胞
の培養液から得られるし、あるいはヒト線維芽細胞を
遺伝子供給源として遺伝子組換え法によって得ることもで
10 きる。本発明では特に、肝細胞増殖因子類の一つであ
って、配列表の配列番号 2 に示したアミノ酸配列を有する
タンパク質あるいはその同効物である組換えヒト肝細胞
増殖因子タンパク質を提供することをも目的とする。

それはヒト正常線維芽細胞由来であって、より正常型で
あって好ましいと考えられる。本発明に従えば、造血幹
15 細胞増加活性を有し、肝細胞増殖因子類に属するタンパ
ク質あるいはその同効物のアミノ酸配列をコードする塩
基配列を含むことを特徴とする DNA、そのコード塩基
配列を発現可能に組み込んでなる組換え発現ベクター、
その発現ベクターにより宿主細胞を形質転換することに
20 より得られた形質転換体、更にはその形質転換体を、栄
養培地中該タンパク質が発現可能な条件下に培養して、
該培養物から造血幹細胞増殖活性を持ち、肝細胞増殖因
子類の一つであって、組換えヒト肝細胞増殖因子である
タンパク質を採取することを特徴とする組換えヒト肝細胞
25 増殖因子であるタンパク質の製法をも提供する。特に
本発明は、ヒト正常線維芽細胞由来であって、より正常

1 型であって好ましいと考えられる組換え体及びその製法、用途に関する。

本発明で開示される肝細胞増殖因子類の少なくとも一つを有効成分として含有する剤は、骨髓抑制の治療剤や
5 骨髓機能不全の治療剤として使用して有用である。

本発明で開示される肝細胞増殖因子類の少なくとも一つを有効成分として含有する剤は、末梢血幹細胞および骨髓幹細胞の *in vitro* における増殖に有効で、
本発明はその剤を用いたこれらの幹細胞の剤を用いた *in vitro* 増殖法あるいは培養法をも提供する。
10

図面の簡単な説明

第1図は発現ベクター *pSR α BX* の構築図を示す。

第2図はヒト正常線維芽細胞由来 *HGF cDNA* の塩基配列およびアミノ酸配列を示す。
15

第3図は動物細胞発現用ヒト *HGF* 発現ベクター *pSR α FD Γ -1* の構築図を示す。

第4図は実施例3(6)で得られた正常線維芽細胞由来ヒト肝細胞増殖因子産生サル *COS-1* 細胞の培養上清よりの *DEAE* セファセル溶出液の画分と *HGF* 活性との関係を示す。
20

第5図は実施例3(6)で得られた正常線維芽細胞由来ヒト肝細胞増殖因子産生サル *COS-1* 細胞の培養上清よりのヘパリン・セファロースクロマトグラフィー処理して得られたヘパリン溶出液の画分と *HGF* 活性との関係を示す。
25

1 第6図は実施例3(6)で得られた正常線維芽細胞由
来ヒト肝細胞増殖因子産生サルCOS-1細胞の培養上
清よりの亜鉛キレートアフィニティークロマトグラフィー
5 処理して得られた亜鉛溶出液の画分とHGF活性との
関係を示す。

第7図は実施例4で精製して得られた組換え型ヒトH
GFの非還元下でのSDS-ポリアクリルアミド電気泳
動パターンを示す。

10 第8図はヒト胎盤由来HGFと精製線維芽細胞由来H
GFのNFS60細胞増殖刺激活性を示す。

第9図は実施例1の逆相高速液体クロマトグラフィー
のクロマトグラムを示す。

発明を実施するための最良の形態

15 本発明者等は、マウス由来の未分化骨髓芽球細胞株N
FS60 [Kevin L. Holmes et. al
. : Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 8
2, 6687~6691 (1985)] がインターロイ
キン3 (IL-3) に依存して増殖すること、及びIL
20 -3がこれまで知られている既知の造血因子のなかでは
、未分化の造血幹細胞に作用するサイトカインの一つで
あることに着目し、NFS60株に対する増殖活性を指
標にしてIL-3以外の造血幹細胞増殖因子の探索を目
25 的として鋭意研究を重ねた。その結果、インターロイキン
1 (IL-1)、インターロイキン6 (IL-6)、
インターロイキン7 (IL-7)、インターロイキン8

1 (IL-8)、インターロイキン11(IL-11)、
c-kitリガンド等の造血因子を産生していることが
知られている線維芽細胞に造血幹細胞増殖活性を有する
因子を発見し、それが肝細胞増殖因子類に属する新規な
5 因子であることを見出した。そして、本増殖因子がヒト
骨髓細胞及びマウス骨髓細胞を使用した評価系において
造血幹細胞の増殖を支持することをも見出した。

この新規な因子は、未分化の造血幹細胞の増殖を支持
する活性を有し、分子量が約60,000である配列表
10 の配列番号1に示したN末端アミノ酸配列を有する新規
生理活性タンパク質である。

またこの新規な因子は、表1のアミノ酸組成を有する
。本発明のこの新規な因子である生理活性タンパク質の
N末端アミノ酸配列及びアミノ酸組成は、既知のタンパ
15 ク質とは異なるので、これは新規の造血因子に属するも
のである。

この本発明の新規な因子は、下記で詳しく説明するよ
うに生理活性タンパク質として、ヒト正常線維芽細胞の
培養で得られた培養液を原料にして、数種のクロマトグ
20 ラフィーを組み合わせることで精製を行なうことにより純品形
態で得ることができる。

こうして得られる本発明のこの生理活性タンパク質の
物理化学的性質及び生物学的性質の詳細を以下に記載す
る。

25 (1) 分子量：

60,000 [SDS-ポリアクリルアミドゲル]

1 電気泳動法 (L a e m m l i U. K. : N a t u
 r e, 2 2 7, 6 8 0 - 6 8 5 (1 9 7 0)]

(2) N末端アミノ酸配列 (1 6 残基)

配列表の配列番号 1 に示す。

5 (3) アミノ酸組成

表 1 に示す。

(4) 生物活性

A. マウス由来の未分化骨髄芽球細胞 (N F S 6 0
) に対し、増殖活性を示す。

10 B. 5 - フルオロウラシル (5 - F U) 処理マウス
 の骨髄細胞に対し、I L - 3 との併用、又は I
 L - 3 とインターロイキン - 7 (I L - 7) と
 の併用により、増殖活性を示す。

15 C. ヒト正常骨髄由来の造血幹細胞に対し増殖活性
 を示す。

 一方、その造血幹細胞増加活性を有する因子が肝細胞
 増殖因子類に属する因子であることから、これまで肝細胞
 増殖因子類の一つであって、代表的肝細胞増殖因子 [
20 N a k a m u r a, T. e t. a l : B i o c h e m.
 B i o p h y s. R e s. C o m m u n., 1 2 2, 1
 4 5 0 ~ 1 4 5 9 (1 9 8 4)] として報告されている
 増殖因子についても研究を進め、これが N F S 6 0 株に
 対する増殖活性を有するものであると考えた。さらに、
25 本増殖因子がヒト骨髄細胞及びマウス骨髄細胞を使用し
 た評価系において造血幹細胞の増殖を支持するものであ

1 るとも考えられ、造血幹細胞増加活性を有するとも考えられる。

 なお、肝細胞増殖因子類のうちには、肝実質細胞に対する増殖活性の他に、上皮細胞の運動促進活性 [G h e
5 r a r d i, E. , e t. a l. : N a t u r e, 3 4
6, 2 2 8 (1 9 9 0)] 及び腫瘍細胞障害活性 [H i
g a s h i o, K. e t. a l. : B i o c h e m. B
i o p h y s. R e s. C o m m u n., 1 7 0, 3 9
7 - 4 0 4 (1 9 9 0)] などの生理作用が報告されて
10 いるが、これまで骨髓造血幹細胞に対する作用は知られていなかった。

 さらに、肝細胞増殖因子類の一つであって、肝臓由来の代表的肝細胞増殖因子は、すでに遺伝子クローニングが行なわれその全塩基配列が決定されている [N a k a
15 m u r a e t. a l. N a t u r e, 3 4 2, 4 4 0
- 4 4 3 (1 9 8 9)] ので、それを本発明において造血幹細胞増加剤として使用することもできよう。また、本発明において造血幹細胞増加剤として使用する肝細胞増殖因子類に属する因子は、ヒト正常線維芽細胞等の細胞培養によっても生産することができる。さらには、ヒ
20 ト正常線維芽細胞等から遺伝子を取り出し、そうして得られた遺伝子に遺伝子組換え技術を応用して組換え体の培養により生産することもできる。

 本発明に従えば、このように遺伝子組換え技術によっても新規な因子を得ることができる。この新規な因子は
25 配列表の配列番号 2 に示したアミノ酸配列を有すること

1 0

1 を特徴としている。この新規な因子は、下記で具体的に説明するようにクローニングされたcDNAを用いて得ることができる。

5 上記因子は、例えばヒト正常線維芽細胞の培養で得られた培養液を原料にして、数種のクロマトグラフィーを組み合わせて精製を行なうことにより純品を得ることができる。

10 ヒト正常線維芽細胞等の細胞増殖あるいは培養は、通常の各種の細胞培養用培地を用いて行うことができ、そのようなものとしては、例えば炭素源、窒素源、ビタミン、アミノ酸、核酸塩基、無機塩などを含有し、適宜肉汁、ペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、魚肉エキス、バレイショ、麦芽汁、牛乳、血液、血清、ホルモン、抗
15 生物質、細胞増殖因子などから選ばれたものを加えたものがあげられるが、好適な培地は一般に広く市販されているものを使用してそれをそのままあるいは適当に改変して用いることができる。

20 そのような培地としてはRPMI-1640培地、MEM培地、BME培地、ダルベッコイーグル培地、DMEM培地、マッコイ5A培地、イスコフ培地、ハムF12培地等が挙げられる。

25 上記ヒト正常線維芽細胞等の細胞の増殖又は培養にあたっては、該ヒト正常線維芽細胞の生育に適したpH、温度、通気、攪拌、培地交換の頻度等の条件は、実験等により適宜決定することができる。

1 ヒト正常線維芽細胞を培養する場合、必要に応じて細胞付着因子、例えばコラーゲン、フィブロネクチン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン等を加えたり、マイクロキャリアビーズ、例えばデキストラン、
5 ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ゼラチン、ガラス等を用いることができる。

 上記増殖又は培養することにより得られたヒト正常線維芽細胞は次に必要に応じて誘導処理、例えば通常のポリ I / C 等の誘導剤で処理して造血幹細胞増加活性を有し、肝細胞増殖因子類に属する新規タンパク質を誘導す
10 ることができ、こうして得られた本発明のタンパク質は、通常の操作により分離採取することができる。

 この分離採取法としては、例えば細胞の超音波破碎、機械的破碎、凍結及び融解による方法、浸透圧ショック
15 等による方法のほか、培養上清から、例えばタンパク質沈澱剤を用いて沈澱処理する等して分離する方法などがあげられる。

 上記の分離方法に加えて、更に目的とするタンパク質は、その物理学的性質や化学的性質を利用して、一般に
20 広く採用されている各種分離精製方法を適用して精製することができる。

 このような分離精製方法としては、ホモジュナイザー、超音波細胞破碎等による可溶化処理、各種塩類を含んだ緩衝液による抽出処理、酸またはアルカリによる可溶化あるいは沈澱処理、さらには有機溶媒による抽出あるいは沈澱処理、硫安等の蛋白沈澱剤を用いる沈澱処理等
25 。

1 による塩析、透析、メンブレンフィルターなどを用いた
限外濾過処理、吸着クロマトグラフィー、ゲル濾過クロ
マトグラフィーなどを用いたゲル濾過処理、イオン交
5 換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ア
フィニティクロマトグラフィー、向流分配クロマトグラ
フィー、高速液体クロマトグラフィー、等電点あるいはゲ
ル電気泳動などがあげられ、それらは単独あるいは適宜
組み合わせる用いられる。

ヒト正常線維芽細胞由来のものの場合、ブルー色素を
10 結合させた担体（ブルー担体）、亜鉛をキレート結合さ
せた担体（亜鉛キレート担体）、ヘパリンを結合させた
担体（ヘパリン担体）、抗体を結合させた担体等を用い
るアフィニティクロマトグラフィーが有利に使用できる
。特に、亜鉛キレート担体、ブルー担体、ヘパリン担体
15 が好ましく用いることが出来る。さらに好ましくは、亜
鉛キレート担体とヘパリン担体を組合わせて使用する方
法であり、両担体の使用順序は特に限定されないが、ヘ
パリン担体を使用した後に、亜鉛キレート担体を用いる
のが特に好ましい。

20 本発明で使用する亜鉛キレート担体としては、アガロ
ース、セルロース、ポリアクリルアミドゲルなどに、ビス
カルボキシメチルイミノ基〔 $N(CH_2COOH)_2$ 〕などのキレート能を有する交換基が結合した担体を、
塩化亜鉛などの亜鉛塩の溶液で処理した担体が挙げられ
25 る。好ましくは、「キレーティングセファロース」（P
h a r m a c i a 社製）などの不溶性多糖類系担体に亜

1 鉛をキレートさせた担体を用いられる。

亜鉛キレート担体による肝細胞増殖因子類の精製操作は次のように行う。すなはち、まず肝細胞増殖因子類を含む溶液を亜鉛キレート担体に接触吸着させる。吸着は
5 、バッチ法、カラム法どちらでも可能であるが、カラム法のほうが吸着効率が高い。

溶離は、リン酸、酢酸、クエン酸などの酸性緩衝液で行い、pH 5 以下が好ましい。しかし、高イオン強度下では、さらに高いpHでの溶離が可能となる。また、イミダゾール、ヒスタミン、グリシンあるいは塩化アンモニウムの濃度を高めながらの勾配溶出も好結果が得られる。
10 EGT AやEDT Aのようなキレート剤を用いてゲルから金属イオンを剥ぎ取ってしまう方法を用いてもよい。

15 イオン強度は、リン酸、酢酸、クエン酸などの緩衝液の濃度を上げたり、塩化ナトリウム、塩化カリウムのような中性塩の添加（0. 2～1. 0 M）により増加させることができる。

20 溶出剤の組成、液量は特に限定されるものではなく、最適な溶離条件は存在する夾雑タンパク質、および肝細胞増殖因子類の量、カラムの寸法などに応じて適宜決定される。

本発明で使用するヘパリン担体としては、骨格担体としてセルロース、アガロースなどを材料とする多糖類系
25 および合成高分子系などの不溶性担体にヘパリンを結合させたものならばいずれでもよい。「ヘパリン・セファ

1 ロースCL-6B」(Pharmacia社製)、「ヘ
パリントヨパール」(東ソー社製)や「ヘパリンセルロ
ファイン」(チッソ社製)が挙げられる。

5 肝細胞増殖因子類を含む溶液をヘパリン担体に接触さ
せる場合、pHを5～10に調節することが望ましい。
特に好ましくは、ヘパリンに対する親和性を十分に確保
できるpH5.5～8.0の範囲でイオン強度0.3以
下がよい。このようにヘパリン担体に吸着させた肝細胞
10 増殖因子類は、イオン強度を高くすることで回収する
ことができる。例えば、リン酸ナトリウム緩衝液などの緩
衝液に塩化ナトリウム、硫酸アンモニウムなどの無機塩
を添加した液により回収することができる。回収方法は
、塩濃度をグラジエント式に増加させる方法でも、段階
的に増加させるステップワイズ式でもよい。具体的に用
15 いられるイオン強度は0.3～3で、好ましくは0.5
～2である。

上記のようにして精製分離して得られた造血幹細胞増
加活性を有し、肝細胞増殖因子類に属する天然型のタン
パク質は、塩酸等の酸、ペプシン、キモトリプシン、カル
20 ボキシペプチダーゼ等のタンパク質分解酵素等で加水
分解した後、得られたペプチド断片をイオン交換クロマ
トグラフィー等のクロマトグラフィーにかけて、そのア
ミノ酸組成を分析すると共にそのアミノ酸配列を決定す
ることができる。

25 本発明の天然型の造血幹細胞増加活性を有し、肝細胞
増殖因子類に属するタンパク質のアミノ酸組成の分析法

1 をより詳しく説明すると、まず精製された該造血幹細胞
増加活性を有し、肝細胞増殖因子類に属するタンパク質
を塩酸で加水分解した後、フェニルイソチオシアネート
5 (P I T C) を反応させてアミノ酸をそれぞれ対応する
フェニルチオカルバミル誘導体に変換し、それを逆相高
速液体クロマトグラフィーにかけて定量する方法 (P I
T C 法) があげられる。

 こうして分析せしめられたアミノ酸配列は、天然型の
造血幹細胞増加活性を有し、肝細胞増殖因子類に属する
10 タンパク質を遺伝子組換え技術を利用して製造するに当
たり、それを利用することが出来る。

 つぎに、代表的な遺伝子組換え技術を応用しての、本
発明において造血幹細胞増加剤として使用する肝細胞増
殖因子類に属する因子の取得法を記載する。
15

 ヒト正常線維芽細胞よりRNAを得る方法としては、
通常の方法、例えば、ポリソームの分離、ショ糖密度勾
配遠心や電気泳動を利用した方法などがあげられる。上
記ヒト正常線維芽細胞よりRNAを抽出する法としては
20 、グアニジン・チオシアネート処理後CsCl密度勾配
遠心を行うグアニジン・チオシアネート-塩化セシウム
法 (Chirgwin, et al., Biochem
istry, 18, 5294 (1979))、バナジウム
複合体を用いてリボヌクレアーゼインヒビター存在下
25 に界面活性剤で処理したのちフェノール処理を行う方法
(Berger, et al., Biochemist

1 ry, 18, 5143 (1979))、グアニジン・チ
オシアネート-ホット・フェノール法、グアニジン・チ
オシアネート-グアニジン塩酸法、グアニジン・チオシ
アネート-フェノール・クロロホルム法、グアニジン・
5 チオシアネートで処理した後塩化リチウムで処理してR
NAを沈澱させる方法などの中から適当な方法を選んで
行うことができる。

ヒト正常線維芽細胞より通常の方法、例えば、塩化リ
チウム/尿素法、グアニジン・イソチオシアネート法、
10 オリゴdTセルロースカラム法等によりmRNAを単離
し、得られたmRNAから通常の方法、例えば、Gub
lerらの方法 [Green, 25, 236-269 (1
983)]、H. Okayamaらの方法 [Mol. C
ell. Biol., 2, 161, (1982) &
15 3, 280, (1983)] 等によりcDNAを合成す
る。得られたmRNAからcDNAを合成するには、基
本的にはトリ骨芽球ウイルス (AMV) などの逆転写酵
素などを用いるほか一部プライマーを用いてDNAポリ
20 メラーゼなどを用いる方法を組み合わせてよいが、市販
の合成あるいはクローニング用キットを用いるのが便利
である。

このcDNAを通常の方法、例えば、Seedの方法
[Nature, 329, 840-842 (1987)
] に準じ、発現ベクターあるいはプラスミド、ファージ
25 などに組み込み、この組換えDNAを用い、大腸菌など
を用いてcDNAライブラリーを作製する。

1 上記 cDNA をベクターに挿入するにあたっては、同一制限酵素を用いて生ずるところの接着末端を利用するか、必要に応じて合成のリンカー部あるいはアダプター部を付加したり、ホモポリマーを加えたりする等の通常の方法を用いて行うことができる。

5 常法 (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982) に従ってこれら操作は行うことができる。cDNA を組み込むためのベクターあるいはプラスミドとしては CDM8、pcDL-SR α 296、pBR322、pUC18、pUC19、pUB110 などが挙げられるが、これらに限定されることなく通常の cDNA を組み込むためのベクターあるいはプラスミドが用いられる。大腸菌などを用いて cDNA ライブラリーを作製するためのベクターあるいはプラスミドが好ましい。cDNA を組み込むためのベクターがファージの場合は、 λ gt10、 λ gt11 などが挙げられるが、これらに限定されることなく通常の cDNA を組み込むためのファージが用いられる。

15 こうして得られた組換えベクターを宿主に導入するには、通常使用せられる各種の方法が使用できる。

20 このような方法として、ベクターがプラスミドの場合は、例えば Hanahan et al. J. Mol. Biol. 166, 557 (1983) に従った CaCl₂ 又は RbCl を共存させて調製されたコンピテント細胞に、これらベクターを取り込ませる方法がある。ま

1 たベクターがファージの場合インビトロパッケージング
法などを用いて適当な増殖期にある宿主に、組換えファ
ージベクターを感染させる方法等があげられる。

5 こうして得られたcDNAライブラリーを保持する宿
主細胞としては、具体的には大腸菌MC1061/P3
、NM514、NM522、JM101、C600など
が挙げられるが、これらに限定されることなく通常のc
DNAライブラリーを保持する宿主細胞が用いられる。

10 次に、肝細胞増殖因子類に属するヒト肝細胞増殖因子
の一つのN末端及びC末端の塩基配列[Nakamura
et. al. Nature, 342, 440-44
3 (1989)]をもとに、プローブ用オリゴヌクレオ
チドを合成し、このオリゴヌクレオチドをP³²で標識し
15 たプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーション
法、ブランクハイブリダイゼーション法、ハイブリダイ
ゼーション・トランスレーションアッセイ法、プラス・
マイナス法などによって目的のcDNAを得ることがで
きる。

20 より詳しくは、組換え体のブランクのDNAを、ナイ
ロンメンブレン等のフィルター上に固定し、次にこれを
標識したプローブと反応させ、このプローブと選択的に
結合するDNA配列を有する組換え体を選択する。

25 上記ここで使用されるプローブとしては、目的のDN
A配列に対して相補的な配列を有する核酸配列のことを
指し、DNAでもRNAでもよく、また化学合成したも
のでも天然のものでも、あるいは組換えDNAの手法で

1 得られたものでもよいが、公知の方法を適用して化学的に合成されたDNA配列を用いるのが一般的であり好ましい。

5 ここでオリゴヌクレオチド合成法としては、例えばリン酸トリエステル法 (Tetrahedron, 34, 3143 (1978), Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 36, 135 (1979), Nucleic Acids Res., 10, 2597, 6553 (1982))、ホスホアミダイト法 (10 Nature, 310, 105 (1984))等の常法に従って、核酸の化学合成を行う方法、これらの方法を組合せた方法等があげられる。

次に別の方法として、上記肝細胞増殖因子類に属するヒト肝細胞増殖因子の一つのN末端及びC末端の塩基配列 [Nakamura et. al. Natur, 342, 440-443 (1989)] をもとに、2種類のプライマーをDNAシンセサイザーにて合成し、各プライマーをcDNAとともにTaqDNAポリメラーゼ等のDNAポリメラーゼ存在下、DNAの変性、次いでプライマーのアニールリングをなし、プライマーの伸長反応を、例えばPerkin-Elmer Cetus社のDNAサーマルサイクラーを用い行なうことができる。これを電気泳動し、目的肝細胞増殖因子(HGF)類に属するヒト肝細胞増殖因子cDNAを常法 (Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory. New Yo

15
20
25

1 r k. 1982) に従って調製する。

またヒト線維芽細胞等の細胞培養によって得られた肝細胞増殖因子類に属するヒト肝細胞増殖因子の一つのN末端塩基配列にある16個のアミノ酸配列に基づいて同様にプライマーをDNAシンセサイザーにて合成し、各
5 プライマーをプラスミドDNAとともにTaqDNAポリメラーゼ等のDNAポリメラーゼ存在下、DNAの変性、次いでプライマーのアニールリングをなし、プライマーの伸長反応を、例えばPerkin-Elmer Cetus社のDNAサーマルサイクラーを用い行なうこともできる。これを電気泳動し、目的肝細胞増殖因子(HGF)類に属するヒト肝細胞増殖因子cDNAを上記したような常法に従って調製する。なお、このように異なる遺伝子源やプライマー源、さらにはプローブ源を用いるとそれにしたがって様々な異なる塩基配列をもつ肝細胞増殖因子類に属するヒト肝細胞増殖因子cDNAを得ることが認められる。
15

こうして得られた組換えDNAは通常の方法に従って制限酵素等で処理され、そのcDNA塩基配列が決定される。cDNA塩基配列を決定するために用いられる方法としては、例えばマクサム・ギルバート法、サンガーのダイデオキシ法、例えばダイデオキシヌクレオチド・チェインターミネーション法(Sanger, Science, 214, 1205 (1981), Methods in Enzymology, 65, 560~580 (1980), Messing, J. et al. N
20
25

1 u c l e i c A c i d s R e s . , 9 , 3 0 9 (1
 9 8 1) な ど が あ げ ら れ る 。 さ ら に 、 上 記 し た 単 離 m R
 N A と 配 列 決 定 さ れ た c D N A の 一 部 を 用 い て プ ラ イ マ
 ー イ ク ス テ ン シ ョ ン 法 を 行 い c D N A を 合 成 し 、 上 記 の
5 よ う に 組 換 え D N A し て 得 る こ と も 可 能 で あ る 。

 これらの方法は適宜それを組み合わせて行うことができる。

 ところで、遺伝子組換え技術によれば、DNA鎖の切
断、削除、付加及び結合、更にはDNA鎖中の塩基の置
10 換は、通常の手法にしたがって行うことができるので、
 本発明のDNAは、特に配列表の配列番号2に示された
 塩基配列を有するDNAに関するのみでなく、本発明の
 目的を逸脱しない範囲で上記したような改変・修飾を加
 えたものにも関する。

15 このような改変・修飾手法の代表的なものとしては、
 オリゴヌクレオチド指定変異法 (o l i g o n u c l e
 o t i d e d i r e c t e d m u t a g e n e s i
 s) と し て 知 ら れ た 方 法 、 例 え ば M . S m i t h 及
 び S . G i l l a m 「 G e n e t i c E n g i
20 n e e r i n g (J . K . S e t l o w 及 び
 A . H o l l a e n d e r e d s .) , V o l ,
 3 , p . 1 (1 9 8 1) 、 M e t h o d s i n
 E n z y m o l o g y , V o l . 1 5 3 - 1 5 5 (
 1 9 8 7 年) , A c a d e m i c P r e s s , C
25 A に 記 載 の も の あ る い は そ の う ち に 引 用 さ れ た 文 献 に
 記 載 の も の な ど が あ げ ら れ る 。

1 配列表の配列番号 2 に示された塩基配列を有する遺伝子の改変・修飾として特に好ましいのは、目的とするタンパク質の安定性、生物学的活性を高めるようなものが挙げられる。

5 さらにまた、配列表の配列番号 2 に示されたアミノ酸配列を有するペプチドの有する活性のうち、未分化の多能性造血幹細胞の増殖活性を高めるような改変・修飾があげられる。

10 こうしてクローン化された造血幹細胞増加活性を有し、肝細胞増殖因子類に属するタンパク質あるいはその同効物のアミノ酸配列の全部あるいは一部をコードする塩基配列を含む cDNA はその発現に適したベクターに組み換えられてそのコード塩基配列をもつ cDNA を発現可能に組み込んでなる組換え発現ベクターとされる。

15 特に、本発明の配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列のタンパク質あるいはその同効物の配列の全部あるいは一部をコードする塩基配列を含む cDNA は、適当な発現用ベクターに組換えられ、次に適当な発現用宿主にその組換えベクターを導入して形質転換し、得られた組換え
20 体を培養し、適当に発現誘導することにより、目的の造血幹細胞増加活性を有するタンパク質を取得することができ有用である。

25 本発明の造血幹細胞増加活性を有し、肝細胞増殖因子類に属するタンパク質あるいはその同効物のアミノ酸配列の全部あるいは一部をコードする塩基配列を含む cDNA を用いて目的のタンパク質を宿主中で産生させるに

1 あたっては、成熟タンパク質として、即ちシグナルペプ
チドを取り去った形で生産させることもできるし、上記
シグナルペプチドをそのまま利用したりあるいは適当な
宿主細胞等に適合したシグナルペプチドを付加して宿主
5 細胞等から分泌産生させることもできる。

さらにまた本発明の造血幹細胞増加活性を有し、肝細胞増殖因子類に属するタンパク質あるいはその同効物は他の組換えタンパク質あるいはペプチド等との融合タンパク質あるいはペプチドとして産生させて、単離しある
10 いは単離せずに酵素あるいは化学的に消化処理して目的のものとすることもできる。

本発明の造血幹細胞増加活性を有し、肝細胞増殖因子類に属するタンパク質あるいはその同効物を効率よく発現させるために、プロモーター、リボソーム結合部位（
15 例えばSD配列）、翻訳開始部位やコドンの制御下にある下流域に、そのコード塩基配列を含むcDNAを配置し、次いで終止部位やコドン、ターミネーターを配置するようにすることができる。つまりこのような場合において、それに用いる遺伝子のDNA配列中には、開始コ
20 ドン及び終止コドンが必要で、必要に応じてそれらは公知の方法を用いて付与される。

またここで利用される発現用ベクターとしては、宿主中で自律複製できるものであれば特に制限なく使用できるが、そのベクター中に複製起源、選択マーカー、プロ
25 モーター、RNAスプライス部位、ポリアデニル化シグナルなどを有するものが好ましく使用できる。

1 組換え発現ベクターの選択マーカーとしては、各種抗
生物質耐性遺伝子、例えばアンピシリン耐性遺伝子、テ
トラサイクリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等
が挙げられる。

5 またこれらベクターとしては、各種バクテリア由来の
もの、バクテリオファージ由来のもの、昆虫や哺乳動物
細胞をふくむ動物ウイルス由来のものがあげられ、各種
ウイルスベクター、各種プラスミドベクター、コスミド
ベクター、シャトルベクター等があげられる。

10 またこれらベクターとしては、大腸菌、特にE K型プ
ラスミドベクター、 λ g tタイプファージベクター、緑
膿菌由来のベクター、枯草菌由来のベクター、酵母由来
のベクター、SV 40由来のベクター、BPV由来のベ
クター、レトロウイルス由来のベクター等があげられる
15 。 具体的には、pBR 322、pUC 18、pUB 1
10、pRB 15、 λ g t 10、 λ g t 11、SV 40
、BPV等が挙げられる。

 上記ベクターで利用できるプロモーターとしては、宿
主中で発現できるように働くものであれば特に制限はな
20 い。大腸菌での発現用プロモーターとしては、トリプト
ファン (t r p) プロモーター、ラクトース (l a c)
プロモーター、トリプトファン・ラクトース (t a c)
プロモーター、T7プロモーター、バクテリオファージ
由来のラムダ (λ) PL プロモーター等の各種の当業者
25 に良く知られたものが挙げられる。

 酵母用のベクターにおいて用いられており、制御配列

1 として代表的なものとしては、解糖系酵素の合成に関する
 プロモーター、例えばグリセリン酸—3—リン酸キナ
 ーゼに関するプロモーター、グリセルアルデヒド—3—
 リン酸デヒドロゲナーゼに関するプロモーター、ヘキソ
5 キナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、フルクトー
 スリン酸キナーゼ、グルコース—6—リン酸イソメラー
 ゼ、3—ホスホリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコース
 イソメラーゼおよびグルコースキナーゼに関するプロモ
 ーター等のほか、アルコールデヒドロゲナーゼ、チトク
10 ロームC、酸ホスファターゼ等に関するプロモーターが
 挙げられる。

 またSV40の初期遺伝子あるいは後期遺伝子プロモ
 ーター、サイトメガロウイルス、ポリオーマウイルス、
 アデノウイルス、牛パヒローマウイルスあるいはトリ肉
15 腫ウイルス由来のプロモーター、モロネイネズミ肉腫ウ
 イルスのLTR、ラウス肉腫ウイルスのLTR、マウス
 乳癌ウイルスのLTR、メタロチオネインに関するプロ
 モーター、免疫グロブリンに関するプロモーター、ヒー
 トショックに関するプロモーター、デヒドロ葉酸に関す
20 るプロモーター、アクチンに関するプロモーター、エロ
 ンゲーションファクターに関するプロモーターなどの哺
 乳動物細胞に適合できるものが挙げられる。

 昆虫細胞などにあっては、核多角体病ウイルス由来の
 ポリヒドリンに関するプロモーターが挙げられる。

25 これらの遺伝子制御配列は、適宜それらを組み合わせ
 たり、あるいは化学的に修飾したりして適当なベクター

1 に組み込んで、本発明の造血幹細胞増加活性を有し、肝
細胞増殖因子類に属するタンパク質あるいはその同効物
のアミノ酸配列の全部あるいは一部をコードする塩基配
列を含むcDNA発現用のベクターを構築することがで
5 きる。

 例えば、翻訳開始コドンATG及び終止コドンTAA
、TGA、あるいはTAGを本発明のcDNAの遺伝子
制御配列として含んでいてよく、それらは一つ以上組み
合わせたり、他のコドンと組み合わせて配列されていて
10 よい。

 本発明のcDNA発現用のベクターには、さらに複数
個の本発明のcDNAを組み込んでその発現を行うこと
もできる。

 本発明の造血幹細胞増加活性を有し、肝細胞増殖因子
15 類に属するタンパク質あるいはその同効物のアミノ酸配
列の全部あるいは一部をコードする塩基配列を含むcD
NA発現ベクターは、これを適当な宿主、特に宿主細胞
に通常知られた方法に従って導入して、その宿主細胞を
形質転換させ、次にそのようにして形質転換された宿主
20 細胞を培養等の方法により増殖させること等により、大
量に形質転換体と呼ばれる該造血幹細胞増加活性を有し
、肝細胞増殖因子類に属するタンパク質あるいはその同
効物のアミノ酸配列の全部あるいは一部を有するペプチ
ド産生能を有する細胞を得ることができる。

25 ここで使用される宿主、特に宿主細胞としては、大腸
菌あるいは大腸菌以外のシュードモナス菌等のグラム陰

1 性細菌、枯草菌、放線菌、等のグラム陽性細菌、酵母、
動細胞、昆虫細胞、植物細胞等の真核細胞のいずれでも
よいが、大腸菌、哺乳動物細胞、例えばC O S細胞、C
H O細胞が好適に使用できる。

5 上記宿主への本発明の遺伝子発現ベクターの導入法と
しては、通常遺伝子組換え技術の分野で使用せられてい
る方法を用いることができ、例えばコンピテント細胞と
上記ベクターとを混合したり、細胞をプロトプラスト化
10 したのち、上記ベクターを担体に結合させて取り込ませ
るか、あるいはリン酸カルシウム共沈法、D E A E デキ
ストラン法、電気パルス法、インビトロパッケージング
法、ウイルスベクター法、マイクロインジェクション法
等を用いて行うことができる。

15 このようにして得られた形質転換体は、その外来遺伝
子の発現を抑制した状態で増殖したのち、該遺伝子の発
現を誘導することもできる。

20 この形質転換体の増殖あるいは培養は、前述したヒト
正常線維芽細胞の場合と同様に通常の各種の細胞培養用
培地を用いて行うことができる。またその他の生育条件、
培養システム、更にはタンパク質の分離精製方法もヒト
正常線維芽細胞の場合と同様である。 本発明の造血幹
細胞増加剤は、未分化の多能性造血幹細胞に対する増殖
活性を示し、骨髓抑制（例えば抗癌剤使用後や骨髓移植
等）に対する治療に有効な造血幹細胞増加剤として、骨
25 髄機能不全（例えば再生不良性貧血や骨髓異形成症候群
等）に対する治療に有効な造血幹細胞増加剤として、ま

1 たは末梢血幹細胞および骨髓幹細胞の *in vitro*
 における増殖に有効な造血幹細胞増加剤として有用であ
 る。

 さらに本発明の造血幹細胞増加剤は、結果的には種々
5 の血液細胞ばかりでなく造血幹細胞の子孫である破骨細
 胞の増殖も促進するため、骨粗鬆症等の治療剤としての
 適用も可能である。

 本発明では特に、肝細胞増殖因子類の一つであって、
 配列表の配列番号 2 に示したアミノ酸配列を有するタン
10 パク質あるいはその同効物である組換えヒト肝細胞増殖
 因子タンパク質が造血幹細胞増加剤として好ましく用い
 られ、未分化の多能性造血幹細胞に対する増殖活性を示
 し、骨髓抑制（例えば抗癌剤使用後や骨髓移植等）に対
 する治療に有効な造血幹細胞増加剤として、骨髓機能不
15 全（例えば再生不良性貧血や骨髓異形成症候群等）に対
 する治療に有効な造血幹細胞増加剤として、または末梢
 血幹細胞および骨髓幹細胞の *in vitro* における
 増殖に有効な造血幹細胞増加剤として有用である。

 それはヒト正常線維芽細胞由来であって、より正常型で
20 あって好ましいと考えられる。

 また、ヒト正常線維芽細胞から得られる天然型ものも
 造血幹細胞増加剤として好ましいと考えられ、上記用途
 に有用である。

 本発明の造血幹細胞増加剤を前記の本発明の用途に用
25 いる場合、そのままもしくは自体公知の薬理学的に許容
 される担体、賦形剤等と混合した医薬組成物として、経

1 口的または非経口的に投与することができる。

 本発明の造血幹細胞増加剤中の活性成分を安定に保つ
 ために、アルギニン、リジン、グリシン、ロイシン、フ
 ェニルアラニン、アスパラギン酸等のアミノ酸、グルコ
5 ース、ショ糖、マンニトール、マンニット等の糖あるい
 は糖アルコール、ゼラチン、コラーゲン、デキストラン
 、プルラン、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、セルロー
 ス等の多糖あるいはタンパク質加水分解物、塩酸等の無
 機酸あるいは酢酸等の有機酸、水酸化ナトリウム等の無
10 機塩基あるいはアミン等の有機塩基等を必要に応じて加
 えることが出来る。

 経口投与のための剤形としては、具体的には錠剤、丸
 剤、散剤、カプセル剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、懸
 濁剤などが挙げられる。かかる剤形は自体公知の方法に
15 よって製造され、製剤分野において通常用いられる担体
 もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用
 の担体、賦形剤としては、乳糖、澱粉、ショ糖、ステア
 リン酸マグネシウムなどが挙げられる。

 非経口投与のための剤形としては、例えば、軟膏剤、
20 注射剤、湿布剤、塗布剤、吸入剤、坐剤、経皮吸入剤な
 どが挙げられる。注射剤は自体公知の方法、例えば、
 本発明の肝細胞増殖因子を通常注射剤に用いられる無菌
 の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化すること
 によって調製される。注射用の水溶液としては生理食塩
25 水、ブドウ糖溶液が挙げられ、油性液としてはゴマ油、
 大豆油などが挙げられ、それぞれ溶解補助剤を併用して

1 も良い。腸内投与に用いられる坐剤は自体公知の方法、
 例えば本発明の造血幹細胞増加剤を通常の坐薬用基剤に
 混合し、成型することによって調製される。

 本発明の造血幹細胞増加剤の有効投与量および投与回
5 数は、投与形態、患者の年齢、体重、治療すべき症状の
 性質もしくは重篤度によっても異なるが、通常成人一人
 当たり0.01～100mgを、好ましくは0.1～10
 mgを一回または数回に分けて投与することができる。

 本発明の新規な造血幹細胞増加活性を有し、肝細胞増
10 殖因子類に属するタンパク質あるいはその同効物は、そ
 れを単独であるいは担体、例えば、ウシ血清アルブミン
 、卵アルブミン、チオグロブリンあるいはヘモシアニン
 （KLH）等に結合、例えば、カルボジイミド、グルタ
 ールアルデヒド、混合酸無水物、ホモ二官能性あるいは
15 ヘテロ二官能性試薬（例えば、マレイミドベンジル-N
 -ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）など）に
 より結合せしめて注射投与し動物を免疫し、こうして抗
 体を得ることが出来る。またこの様に免疫した動物、例
 えばマウスから得た脾臓細胞と、ミエローマ細胞とを通
20 常の方法で細胞融合せしめて、モノクローナル抗体を産
 生するハイブリドーマ細胞を得ることもできる。

 こうして得られた抗体は、それを固相に結合せしめたり、
 標識剤、例えば酵素、補酵素、蛍光、染料などの発
 色団、放射性標識、常磁性金属と結合せしめて測定用試
25 薬とすることが出来る。標準的免疫測定法の例は、酵素
 免疫測定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（R

1 IA)、サンドイッチ免疫測定法などが挙げられる。

これらは、D. Catty「Antibodies -
Vol. I, & Vol. II, a practical
approach」IRL Pressに従って行
5 うことが出来る。

実施例

以下、本発明の実施例を示すが本発明はこれらに限定
されるものではない。

10

実施例 1

正常線維芽細胞由来ヒト肝細胞増殖因子の調製：

30 L培養槽を用い、ヒト正常線維芽細胞、DIP2
(Kobayashi, S. et al. in The
15 clinical potential of in
terferons, ed. Kono, R. and V
ilcek, J., University of To
kyo Press, Tokyo 1982)を10%
FBS-MEM培地-0.3%ビーズ(Cytodex
-1:ファルマシア社製)で、37℃、5日間、攪拌培
20 養を行った。増殖がコンフルエントに到達した後、ME
M培地に切り替え、ポリI/C10 μ g/mlを添加し
、インダクションをかけ、タンパク質産生を誘導した。
37℃、4日間培養を継続し、20 Lの培養液を回収し
25 た。

これを20 mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)で平

- 1 衡化した“ブルー・セファロースカラム”（担体 1 L :
ファルマシア社製）に吸着させ、次いで平衡化に使用し
た緩衝液で洗浄した。その後、0 M から 3 M への Na C
1 の直線濃度勾配でタンパク質を溶出させた。
- 5 得られた活性画分 1 L をゲル濾過で脱塩し、20 mM
トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）で平衡化したヘパリン
・セファロースカラム（担体 100 ml : ファルマシア
社製）に吸着させ、平衡化の緩衝液で洗浄した。次に
、0 M から 3 M への Na C l の直線濃度勾配でタンパク
10 質を溶出させた。
- 得られた活性画分 50 ml をゲル濾過で脱塩後、逆相
高速液体クロマトグラフィーで精製した。“V y d a c
218 TP 510 カラム”（1.0 x 25 cm : セパレ
ーショングループ社製）を用い、0.1% トリフルオロ
15 酢酸水溶液をベースにアセトニトリル濃度を 0 から 50
% に直線的に増加させて溶出させた。結果を図 9 に示す
。
- この活性ピークについて還元下 SDS ポリアクリルア
ミド電気泳動（L a e m m l i U. K. : N a t u r
20 e、227, 680-685（1970））をおこなっ
た処、分子量約 60 K の単一バンドを示した。

実施例 2

N 末端アミノ酸配列およびアミノ酸組成：

- 25 実施例 1 で得られた精製タンパク質を線維芽細胞由来
天然型ヒト肝細胞増殖因子（以下、天然型ヒト HGF と

1 略す) をアミノ酸シーケンサー (Applied Biosystems 477A Protein Sequencer) にかけた結果、N末端16個のアミノ酸
5 配列は配列表の配列番号1の通りであった。このN末端は、Nakamuraら [Nature, 342, 440-443 (1989)] に開示のものとの相同性によりβ鎖のN末端であることがわかった。

この天然型ヒトHGF 4 μg / 25 μl に0.4% チオグリコール酸を含む濃塩酸25 μl を添加し、真空
10 封管下110℃で22時間加水分解後、塩酸を減圧乾固し、ついでこれを蒸留水に溶解後、アミノ酸分析計 (日立835型アミノ酸分析計9で分析を行った。結果を表1に示す。

15

表 1

20

25

アミノ酸	モル%	アミノ酸	モル%
Asp+Asn	12.85	Met	2.00
Thr	5.76	Ile	5.27
Ser	6.31	Leu	5.87
Glu+Gln	9.67	Tyr	4.73
Pro	5.95	Phe	2.72
Gly	9.91	Lys	6.45
Ala	3.86	His	3.45
1/2Cys	3.31	Trp	1.21
Val	4.83	Arg	5.86

1 実施例 3

正常線維芽細胞由来ヒト肝細胞増殖因子 cDNA クロ
ーニング

5 ヒト肝細胞増殖因子の cDNA は、N a k a m u r a
ら [N a t u r e , 3 4 2 , 4 4 0 - 4 4 3 (1 9 8 9
)] によりクローン化されているので、その配列をもと
にプライマーを合成し、ポリメラーゼ連鎖反応 (p o l
y m e r a s e c h a i n r e a c t i o n : P C
R) 法にて cDNA を増幅後、発現ベクターなどにクロ
10 ーニング化することができる。

(1) ヒト正常線維芽細胞 mRNA の単離 :

実施例 1 のようにして培養されたヒト正常線維芽細胞
M R C 5 (理研細胞銀行より入手, R C B 2 1 1) より
15 塩化リチウム / 尿素法 [A u f f r a y e t a l :
E u r . J . B i o c h e m . 1 0 7 , 3 0 3 - 3 1 4
(1 9 8 0)] にて RNA を調製した。得られた RNA
を 1 m M E D T A を含む 1 0 m M トリス塩酸緩衝液
(p H 7 . 5) (以下 T E と略する。) に溶解し、7 0
20 ° C 、 5 分加熱処理した後、1 M L i C l を含む T E を
同量加えた。0 . 5 M L i C l を含む T E で平衡化し
たオリゴ d T セルロースカラムに RNA 溶液をアプライ
し、同緩衝液にて洗浄した。さらに 0 . 3 M L i C l
を含む T E にて洗浄後、0 . 0 1 % S D S を含む 2 m
25 M E D T A (p H 7 . 0) で吸着したポリ (A) R N
A を溶出した。

1 (2) ヒト正常線維芽細胞由来の cDNA ライブラリー
 の作製。

 上記 (1) で得られた 4 μ g のポリ (A) RNA を用
 いて Gubler らの方法 [Green: 25, 236 -
5 269 (1983)] に準じて cDNA を合成した。

 この cDNA を Seed の方法 [Nature, 32
 9, 840 - 842 (1987)] に準じ、発現ベクタ
 ー CDM8 に T4 DNA リガーゼを用いて挿入した。こ
 の組換え DNA を用い、大腸菌 MC1061/P3 を形
10 質転換し、cDNA ライブラリーを得た。タイトレーシ
 ョンにより、この cDNA ライブラリーは独立した 20
 万個の形質転換体からなっていた。これらの形質転換体
 から常法 (Molecular Cloning, Co
 ld Spring Harbor Laborato
15 ry, New York, 1982) に従ってプラスミ
 ド DNA を単離した。

 (3) 正常線維芽細胞由来ヒト肝細胞増殖因子 cDNA
 の単離。

20 ヒト肝細胞増殖因子のうちのアミノ酸配列から適当な
 配列を選択して、例えば N 末端あるいは C 末端の塩基配
 列をもとに、2 種類のプライマーを DNA シンセサイザ
 ーにて合成し、次いでポリメラーゼ連鎖反応 (poly
 merase chain reaction: PCR
25) 法にて cDNA を増幅後、発現ベクターなどにクロ
 ン化する。

1 ヒト肝細胞増殖因子として知られている肝臓由来ヒト
肝細胞増殖因子のN末端及びC末端の塩基配列 [Nakamura et. al. Nature, 342, 440-443 (1989).] をもとに、

5

5' ATGTGGGTGACCAAAC 3'

と

5' CTATGACTGTGGTACC 3'

10 の2種類のプライマーをDNAシンセサイザーにて合成
した。各プライマーを20 pmol、上記(2)で得られたプラスミドDNA 1 µgを0.5 mlのマイクロ遠心チューブに取り、20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.3)、1.5 mM MgCl₂、25 mM KCl、
15 100 µg/ml ゼラチン、50 µM 各dNTP、4単位 Taq DNAポリメラーゼとなるように各試薬を加え、全量100 µlとする。DNAの変性条件を94℃、1分、プライマーのアニーリング条件を50℃、2分、プライマーの伸長条件を72℃、3分の各条件で
20 Perkin-Elmer Cetus 社のDNAサーマルサイクラーを用い、40サイクル反応させた。これを1% アガロースゲルにて電気泳動し、約2.2 kbの正常線維芽細胞由来ヒト肝細胞増殖因子cDNAを常法 (Molecular Cloning. Cold
25 Spring Harbor Laboratory New York. 1982) に従って調製した。

1 別の方法として、実施例1のようにして精製されたヒ
ト正常線維芽細胞由来ヒト肝細胞増殖因子のN末端のア
ミノ酸配列（16個のアミノ酸）に基づいてオリゴマー
をDNAシンセサイザーにて合成し正常線維芽細胞由来
5 ヒト肝細胞増殖因子cDNAをコロニーハイブリダイゼ
ーション法で得ることもできよう。

（4）発現ベクターの調製。

10 発現ベクターCDM8 [Seed, Nature, 3
29, 840-842 (1987)] を制限酵素Hind IIIで切断し、T4 DNAポリメラーゼにて平滑末
端とし、T4 DNAリガーゼにてEcoRIリンカーを
連結した。次に制限酵素Pst Iで切断し、T4 DNA
15 ポリメラーゼにて平滑末端とした。さらに、T4 DNA
リガーゼでKpn Iリンカーを連結し、制限酵素Eco
RIとKpn Iで切断した。これを1% アガロースゲ
ル電気泳動し、約0.36 kbのDNA断片を常法に従
い調製した。一方、pcDL-SR α 296 [Take
20 be et. al. Mol. Cell. Biol.
8, 446-472 (1988)] を制限酵素E
coRI及びKpn Iで切断してアガロースゲル電気泳
動にて約3.4 kbのDNA断片を精製しておき、この
ベクターに上記の操作で得た約0.36 kbのDNA断
片をT4 DNAリガーゼを用いて連結した。これを用い
25 て常法に従い大腸菌を形質転換し、得られた形質転換体
よりプラスミドDNAを常法 (Molecular C

1 loning. Cold Spring Harbor
Laboratory. New York. 1982
)により調製し、目的の発現ベクターpSR α BXを得
た。

5 第1図に発現ベクターpSR α BXの構築図を示す。

このプラスミドDNAを常法に従い制限酵素BstXI
Iで切断し、この反応液を1%アガロースゲルで電気泳
動することにより両末端が制限酵素BstXI切断され
た3.4kbのDNA断片を分離精製した。

(5) 正常線維芽細胞由来ヒト肝細胞増殖因子cDNA
の発現ベクターへのクローニングと塩基配列の決定。

15 上記(3)で得られた2.2kbの正常線維芽細胞由
来肝細胞増殖因子cDNA断片を常法(Molecular
Cloning. Cold Spring Ha
rbor Laboratory. New York.
1982)に従って、T4DNAキナーゼでリン酸化し
、BstXIリンカー(Invitrogen社 N4
20 08-18)をT4リガーゼで連結した。さらにこの反
応液を1%アガロースゲルで電気泳動することによりB
stXIリンカーが連結された2.2kbのDNA断片
を分離精製した。このDNA断片を上記(4)で得た両
末端が制限酵素BstXI切断された3.4kbのDN
A断片にT4リガーゼで連結した。これを用いて常法に
25 従い大腸菌を形質転換し、得られた形質転換体よりプラ

1 スミドDNAを常法により調製した。次にこのプラスミ
ドDNAを制限酵素BamHIで切断することにより目
2 的の正常線維芽細胞由来ヒト肝細胞増殖因子cDNA断
片が組み込まれていることを確認し（該プラスミドをp
5 SR α FDF-1と呼ぶ）、Genesis 2000
DNA analysis system（デュポン社
）を用いて、ダイデオキシ法〔Prober et.
al. Science 238, 336-341（
1987）〕で正常線維芽細胞由来肝細胞増殖因子cD
10 NAの塩基配列を決定した（図-2）。

第3図に動物細胞発現用ヒトHGF発現ベクターpS
R α FDF-1の構築図を示す。

15 （6）サルCOS細胞での正常線維芽細胞由来ヒト肝細胞増殖因子遺伝子の発現。

上記（5）で得られた10 μ gのpSR α FDF-1
を50mMトリス塩酸緩衝液（pH7.5）、400 μ
g/mlのDEAEデキストラン（ファルマシア社）及
び100 μ Mのクロロキン（シグマ社）を含む4mlの
20 RPMI 1640培地に加えておく。一方、直径10cm
のディッシュを用いて10%ウシ胎児血清（ギブコ社）
を含むRPMI 1640培地（ギブコ社）で50%コン
フルエントになるまで増殖させたCOS-1細胞（ATCC
CRL-1650）をPBSで一回洗浄した後
25 、上記で得た4mlのDNA混合液を加え、5%CO₂
の条件下で37℃で培養した。4時間後、細胞をPBS

1 で洗浄した後、20 ml の RPMI 1640 培地にて 5
 % CO₂、37℃の条件で4日間培養し、培養上清中の
 肝細胞増殖因子活性を NFS 60 細胞の増殖を指標に測
5 定したところ、340 単位/ml であった。一方該肝細胞
 増殖因子 cDNA が逆向きに挿入されたベクターを同
 じ方法で COS-1 細胞に導入して得た培養上清中には
 、肝細胞増殖因子活性を認めなかった。

 (7) チャイニーズハムスター CHO 細胞での正常線維
10 芽細胞由来ヒト肝細胞増殖因子遺伝子の発現。

 チャイニーズハムスター CHO 細胞のジヒドロ葉酸還
 元酵素 (DHFR) 欠損株である CHO clone
 DUKXB11 (コロンビア大学 Chasin 博士より
 分与) を 12 ウェルプレートのウェル当たり 1×10^5
15 個となるように 10% ウシ胎児血清と核酸を含んだ α -
 MEM (ギブコ社) 培地にて一夜培養した。

 上記 (5) で得られた $1 \mu\text{g}$ の pSR α FDF-1 と
 $0.1 \mu\text{g}$ の pAdd26SV(A)-3 [{(Sca
 hill, Proc. Natl. Acad. Sci. U
20 SA. 80, 4654-4658 (1983)}] を混合
 しファルマシア社のトランスフェクションキットにて上
 記 CHO 細胞に導入し、18 時間培養した。細胞を 20
 倍希釈して 10% ウシ胎児血清を含む核酸不含 α MEM
 (ギブコ社) にて 10 日間培養をして形質転換細胞を得
25 た。

 得られた細胞株から培養上清中の肝細胞増殖因子活性

1 の 高い細胞株を選び、50 nM メソトレキセート及び 1
0 % ウシ胎児血清を含む核酸不含 α MEM にて培養し、
肝細胞増殖因子産生能の高いクローンを得、CHO-6
-23-2 と名付けた。この細胞の正常線維芽細胞由来
5 ヒト肝細胞増殖因子の産性能は NFS 60 細胞の増殖を
指標とした測定系で 3500 単位 / ml / 2 日であった
。

実施例 4

10 実施例 3 (6) で得られた正常線維芽細胞由来ヒト肝
細胞増殖因子産生サル COS-1 細胞の培養上清より正
常線維芽細胞由来組換え型ヒト肝細胞増殖因子を精製し
た。

(1) 硫安塩析

15 COS-1 細胞の培養上清 13.5 L に 5265 g の
硫酸アンモニウムを徐々に加え溶解した後、4 °C に一夜
置いた。6500 回転で 20 分間遠心することにより沈
殿を集め、20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で
溶解し、同緩衝液にて十分透析し、硫安濃縮液とした。

20

(2) 陰イオン交換クロマトグラフィー

上記 (1) で得られた硫安濃縮液を 20 mM トリス塩酸
緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した 10 ml の DEAE
セファセル (ファルマシ社) に添加した。20 mM トリ
25 ス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で未吸着物質を洗浄後、そ
れぞれ 0.05 M, 0.3 M, 0.5 M の NaCl を含

1 む20 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 100 ml
を順次添加することによる吸着物を溶出した。クロマト
パターンを第4図に示す。NFS 60細胞増殖刺激活性
をもつ画分を集め、DEAEセファセル溶出液とした。

5

(3) ヘパリン・セファロースCL-6Bクロマトグラ
フィー

DEAEセファセル溶出液を0.3 M NaClを含む
20 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した
10 2 mlのヘパリン・セファロースCL-6B (ファルマ
シア社) に添加した。0.3 M、および0.5 M NaCl
を含む20 mMトリス塩酸緩衝液にて順次十分洗浄し
た後、1 M NaClを含む20 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) により溶出した。そのクロマトパターンを
15 第5図に示す。NFA 60細胞増殖刺激活性画分を集め
、ヘパリン溶出液とした。

(4) 亜鉛キレートアフィニティークロマトグラフィー

20 0.3 mlのキレーティング セファロース 6B (ファルマシア社) をカラムに充填し、0.5%塩化亜鉛水溶液を添加後、20 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で洗浄し、亜鉛キレートアフィニティークロマトを調製した。これにヘパリン溶出液12 mlを添加し、1
25 M NaCl含む20 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて洗浄する。さらに、50 mM NH₄Clを含

1 む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で洗浄後、
50 mM イミダゾール及び 0.5 M NaCl を含む 2
0 mM トリス塩酸緩衝液にて溶出した。そのクロマトパ
ターンを第 6 図に示す。NFS60 細胞増殖刺激活性の
5 ある画分を集め、亜鉛溶出液とした。精製された組換え
型の肝細胞増殖因子の収量は約 750 μ g であり、硫酸
濃縮液からの活性回収率は約 44% であった。

(5) SDS ポリアクリルアミド電気泳動

10 上記の工程にて精製された組換え型肝細胞増殖因子を
非還元下で SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (4-
20% ゲル) にかけた。組換え型肝細胞増殖因子は非還
元下では分子量 6.6 万-8.5 万の単一バンドを示し
た。結果を第 7 図に示す。

15

実施例 5

実施例 3 (7) で得られた正常線維芽細胞由来ヒト肝
細胞増殖因子産生チャイニーズハムスター CHO 組換え
細胞株 CHO-6-23-2 の培養上清液より、正常線
20 維芽細胞由来組換え型ヒト肝細胞増殖因子を精製した。

(1) 陽イオン交換クロマトグラフィー

CHO-6-23-2 細胞の培養液 25 ml を 20 mM
M トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) で十分透析し、20
25 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) で平衡化した 0.
5 ml の CM-セファデックス (ファルマシア社) カラム

1 に添加した。20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8)
 で洗浄後、0.5 M の NaCl を含む 20 mM トリス塩
 酸緩衝液 (pH 6.8) で溶出した。NFS 60 細胞増
5 殖刺激活性のある画分を集め、CM-セファデクス溶出
 液とした。

 (2) ヘパリン・セファロース CL-6B クロマトグラ
 フィー

 “0.5 M の NaCl を含む 20 mM トリス塩酸緩衝
10 液 (pH 8.0) で平衡化した 0.1 ml のヘパリン・
 セファロース CL-6B に CM-セファデクス溶出液を
 添加し、0.5 M の NaCl を含む 20 mM トリス塩酸
 緩衝液 (pH 8.0) で洗浄後、1 M の NaCl を含む
 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で溶出した。
15 NFS 60 細胞増殖刺激活性のある画分を集め、ヘパリン
 溶出画分とした。

 (3) 亜鉛キレートアフィニティークロマトグラフィー

 0.1 ml のキレーティング セファロース 6B (ファ
20 ルマシア社) をカラムに充填し、0.5 % 塩化亜鉛
 水溶液を添加後、20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.
 0) で洗浄し、亜鉛キレートアフィニティークロマトを
 調製した。これにヘパリン溶出液を添加し、1 M Na
 Cl 含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて
25 洗浄する。さらに、50 mM NH₄Cl を含む 20 m
 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で洗浄後、50 mM

1 イミダゾール及び0.5M NaClを含む20mMトリス塩酸緩衝液にて溶出した。NFS60細胞増殖刺激活性のある画分を集め、亜鉛溶出液とした。

5 (4) SDSポリアクリルアミド電気泳動

上記の工程にて精製された正常線維芽細胞由来組換え型肝細胞増殖因子を非還元下でSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(4-20%ゲル)にかけ、銀染色法にてゲルを染色した。その結果、組換え型肝細胞増殖因子は
10 非還元下では分子量6.6万-8.5万の単一バンドを示した。

実施例 6

未分化のマウス骨髄芽球細胞(NFS60)に対する
15 増殖活性の測定:

MTT Assay法[T. Mosman: J. Immunological Methods, 65, 55-63 (1983)]に従い、以下の操作により細胞の増殖を測定した。

20 96穴マイクロプレートに50 μ lの培養液(10% FBS-RPM1640)を入れ、実施例1で精製されたヒト正常線維芽細胞由来天然型肝細胞増殖因子(天然型ヒトHGF)を含む溶液50 μ lを加えて2段階希釈した後、NFS60株を2 \times 10⁵個/mlに調整し、
25 各ウェルに50 μ l入れ、炭酸ガスインキュベータで37 $^{\circ}$ C、2日間培養した。

1 次いで、MTT試薬〔3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニル テトラゾニウム
5 ブロマイド〕をPBSに溶解して、5mg/mlに調製〕を10 μ l各ウエルに加え、37°C、炭酸ガスインキュベータで5時間培養した。これに0.04N塩酸添加イソプロパノール150 μ lを加え色素を抽出し、590nmの吸光度をイムノリーダーを用いて測定した。

OD590nmの値がコンフルエントに対し、50%を示す希釈率で実施例1で精製されたヒト正常線維芽細胞由来天然型肝細胞増殖因子(天然型ヒトHGF)は、活性を示した。

実施例7

15 成熟ラット初代培養肝細胞に対するDNA合成促進活性の測定:

成熟ラット肝細胞はSeglenの方法[Seglen, P. O; Methods in Cell Biology, 13, 29-83 (1976)]に従って、分離・調製した。

20 新鮮な 1×10^5 個の肝細胞を以下の組成の培地に加え、1mlとした。MEM(ギブコ社製)、100mMインシュリン(Sigma社製)、50 μ g/ml ゲンタマイシン(Sigma社製)、5%子牛血清(ギブコ社製)およびHGFを含む溶液を加えたものを各々培地として、コラーゲンコート(35mmプラスチックシャーレ
25 (ファルコン社製)に分注した。

1 37℃、7%CO₂、湿度90%の培養器内で4時間
培養した後、血清無添加の5μCi/ml [³H] th i
m i d i n eを含むMEMメディウムで培地交換した。さ
らに、45時間、上記の培養条件で培養した。培養した
5 シャーレを0.9%NaClで6回洗浄した。細胞を1
.5mlの0.33N NaOHに溶解後、全量を氷水中
で試験管に移した。

 これに0.5mlの40%トリクロロ酢酸の1.2N塩
酸溶液を添加し、生じた沈殿を、2,000rpm、1
10 0分間の遠心分離で分離した。この沈殿を0.5mlの0
.33N NaOHに溶解し、このうちの0.3mlをシ
ンチレーションバイアルにとり、0.5mlのAqua s
o l (New England Nuclear社製)
と0.1mlの40%トリクロロ酢酸の1.2N塩酸溶液
15 を加えた。 [³H] チミジン (t h i m i d i n e)
の取り込みをシンチレーションカウンターで測定した。
実施例1で精製されたヒト正常線維芽細胞由来天然型肝
細胞増殖因子(天然型ヒトHGF)は、活性を示した。

20 実施例8

 ヒト正常骨髓細胞を用いる造血幹細胞に対する増殖活
性の測定:

 ヘパリン加正常ヒト骨髓血2~3mlを採取し、シリ
カ存在下で37℃、30分間浮置後、F i c o l l - P
a q u e (ファルマシア社製) 比重遠心法にて非貪食性
25 単核細胞を分離した。洗浄後、10cmプラスチック培

1 養シャーレを用いて付着性細胞を除去し、非貪食性非付
着性単核細胞 (NPNAMNC) とし、 α -メディウム
(Flow Labs 社製) に浮遊させた。

5 培養は、Iscoveらの方法 [Iscove, N.
N. et. al. : J. Cell Physiol.,
83, 309~320 (1974)] を改変したメチル
セルロース法にて行った。上記のNPNAMNC $4 \times$
 10^4 個を以下の組成の無血清培地に加え、1 ml とし
た。 α -メディウム、0.8% メチルセルロース (信越
10 化学社製)、0.1% 再結晶処理された脱イオン化牛
血清アルブミン (crystallized deio
nized bovine serum albumi
n、Sigma 社製)、 $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ Fe-飽和ヒ
トトランスフェリン (Fe-saturated hu
15 man transferrin、Sigma 社製)、
 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 大豆レクチン (soy bean l
ecithin、Sigma 社製)、 $24 \mu\text{g}/\text{ml}$
コレステロール (ナカライ社製)、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 2-
メルカプトエタノール (2-Mercaptoetha
20 nol)、及び試料を加えたものを各々の培地として、
35 mm Lux 培養ディッシュ (culture di
sh、Miles Labs 社製) に分注した。培養は
37°C、5% CO_2 、湿度100%の培養器内で培養し
た。18日間培養後のコロニーを倒立顕微鏡下にて観察
25 し、各コロニー数を算定した。

結果を表2に示す。

表2 ヒト正常骨髓細胞に対する天然型ヒト
HGFの造血幹細胞増殖活性

天然型ヒト HGFの 添加量	コロニー形成 / 4×10^4 個NPNAMNC				
	Blast	CFU-GM	CFU-G	マクロファージ	合計
無添加	10	19	5	6	40
1 ng/ml	6	26	7	1	40
10 ng/ml	17	38	9	1	65
10^2 ng/ml	13	38	9	4	64
10^3 ng/ml	15	30	4	5	54

1 実施例 9

マウス骨髓細胞を用いる造血幹細胞に対する増殖活性の測定：

5 B D F 1 雌性マウスに 1 5 0 m g / K g の 5 - フルオロウラシルを静注し、4 8 時間後に大腿骨から骨髓細胞を採取した。

培養は I s c o v e らの方法を改変したメチルセルロース法にて行った。5 x 1 0 ⁴ 個の骨髓細胞を以下の組成の無血清培地に加え、1 m l とした。

10 α - メディウム、0 . 9 % メチルセルロース、1 % 再結晶処理された脱イオン化牛血清アルブミン、3 0 . 0 μ g / m l F e - 飽和ヒトトランスフェリン、1 6 0 μ g / m l 大豆レクチン (S i g m a 社製) 、9 6 μ g / m l コレステロール (ナカライ社製) 、1 0 ⁻⁴ M
15 2 - メルカプトエタノール、及び試料或いは各種造血因子を加えたものを各々培地として、3 5 m m L u x 培養ディッシュに分注した。各造血因子は以下の濃度で添加した：r m u I L - 3 (コスモバイオ) : 2 0 0 u / m l 、r m u I L - 7 (コスモバイオ) : 2 0 u / m l 。

20

培養は、3 7 ° C 、5 % C O ₂ 、湿度 1 0 0 % の培養器内で培養した。培養 1 7 日間後のコロニーを倒立顕微鏡下にて観察し、各コロニー数を算定した。

25 ヒト正常線維芽細胞由来の天然型肝細胞増殖因子についての結果を表 3 に示す。

表3 5FU処理マウス骨髓細胞に対する天然型
ヒトHGFの造血幹細胞増殖活性

天然型ヒト HGFの 添加量	コロニー形成 / 5×10^4 個 5FU耐性骨髓細胞				
	Blast	CFU-GM	CFU-G	マクロファージ	合計
無 添 加	0	0	0	0	0
10^2 ng/ml	0	0	0	0	0
+ IL-3	0	1	0	0	1
+ IL-3 + IL-7	8	8	5	2	23
10^3 ng/ml	12	14	0	6	32

IL-3; $200 \mu\text{g/ml}$

IL-7; $20 \mu\text{g/ml}$

1 実施例 1 0

ヒト正常線維芽細胞由来組換え型及び天然型 H G F の
肝細胞増殖活性の測定

4 週齢のウイスターラットからコラゲナーゼ還流法に
5 て肝実質細胞を分離した。得られた肝実質細胞を 5 % の
ウシ胎児血清、 1×10^{-9} M インスリン、および 1×10^{-9} M デキサメサゾンを含むウイリアムス E 培地に 2×10^5 個 / m l となるように懸濁した。コラーゲンでコートした 2 4 ウエルマルチプレートに、上記細胞懸濁液を 0. 5 m l ずつ播き、5 % C O₂ の存在下で 3 7 °C、
10 2 0 時間培養した。次に、 1×10^{-9} M インスリン、および 1×10^{-9} M デキサメサゾンを含むウイリアムス E 培地に交換すると同時に所定量のサンプルを添加した。
さらに 2 3 時間培養し、ウエル当たり 0. 5 μ C i の
15 ¹²⁵ I デオキシウリジンを添加して 7 時間培養を続けた。
細胞を P B S で 2 回洗浄後、冷 1 0 % トリクロロ酢酸水溶液で固定した。細胞を 1 ウエル当たり 0. 5 m l の
1 N N a O H で可溶化し、その放射能をガンマカウンターにて測定した。また放射能測定後の試料の一部をとり、ローリー法にて蛋白量を測定した。種々のサンプルを添加したとき肝実質細胞に取り込まれた放射能の量を求め、これを肝実質細胞蛋白質 1 μ g 当たりに換算して、DNA 合成活性 (c p m / μ g 蛋白質) とした。

その結果を表 4 に示した。

表4 ヒト正常線維芽細胞由来組換え型及び
天然型HGFの肝細胞増殖活性

	濃度	肝実質細胞におけるDNA合成 (cpm/ μ g細胞蛋白質/7時間)		濃度	肝実質細胞におけるDNA合成 (cpm/ μ g細胞蛋白質/7時間)
天然型 ヒトHGF	100 ng/ml	131 \pm 3.6	インスリン + 上皮細胞 成長因子	100 nM	100 \pm 3.5
	10 ng/ml	78 \pm 2.5		20 ng/ml	
	1 ng/ml	44 \pm 4.0			
	100 pg/ml	22 \pm 1.0			
	10 pg/ml	30 \pm 1.0			
組換え型 ヒトHGF	100 ng/ml	104 \pm 3.6	天然型 ヒトHGF + インスリン	50 ng/ml	137 \pm 4.4
	10 ng/ml	60 \pm 6.1		100 nM	
	1 ng/ml	26 \pm 0.6			
	100 pg/ml	24 \pm 1.5			
	10 pg/ml	26 \pm 4.2			
上皮細胞 成長因子	50 ng/ml	60 \pm 3.0	組換え型 ヒトHGF + インスリン	50 ng/ml	118 \pm 3.5
	10 ng/ml	58 \pm 5.9		100 nM	
	2 ng/ml	40 \pm 6.7			
インスリン	100 nM	54 \pm 3.0	天然型 ヒトHGF + 上皮細胞	50 ng/ml	140 \pm 8.9
	10 nM	43 \pm 1.5		20 ng/ml	
	1 nM	32 \pm 4.0			

表 4 ヒト正常線維芽細胞由来組換え型及び
(続き) 天然型HGFの肝細胞増殖活性

肝実質細胞におけるDNA合成 (cpm/ μ g細胞蛋白質/7時間)	濃度	肝実質細胞におけるDNA合成 (cpm/ μ g細胞蛋白質/7時間)
組換え型ヒトHGF + 上皮細胞成長因子	50 ng/ml	138 \pm 10.7
	100 nM	
天然型ヒトHGF + インスリン + 上皮細胞成長因子	50 ng/ml	153 \pm 7.5
	100 nM	
	20 ng/ml	

1 実施例 1 で精製されたヒト正常線維芽細胞由来の天然
 型、実施例 4 で精製された C O S 細胞由来の組換え型、
 いずれの H G F も 1 0 n g / m l で D N A 合成活性を示
 し、インスリンおよび／または上皮細胞成長因子の存在
5 下で肝実質細胞の D N A 合成活性が増強された。

実施例 1 1

 ヒト正常線維芽細胞由来組換え型および天然型 H G F
 の正常マウス骨髓細胞を用いたコロニー形成刺激活性

10

 B D F 1 マウスの大腿骨から骨髓細胞を採取し常法 (
Metcal f C l o n a l c u l t u r e o f
 h e m o p o i e t i c c e l l s : t e c h n
 i q u e s a n d a p p l i c a t i o n s . E
15 l s e v i e r A m s t e r d a m) に従って 2 X 1
 0 4 個の骨髓細胞を 0 . 9 % メチルセルロース、1 X 1
 0 - 4 M 2 - メルカプトエタノール、2 0 % ウシ胎児血
 清、および種々の濃度の H G F 試料を含む 1 m l の α M
 E M 培地に懸濁し、5 % C O ₂ 存在下で 3 7 ° C 7 日間培
20 養し、コロニーを倒立顕微鏡下にて観察しコロニー数を
 算定した。

 その結果を表 5 に示した。

25

1 表5 無処理骨髓細胞を用いたコロニーアッセイ

	天然型ヒト正常線維芽 細胞由来HGF (単位/ml)	GMクラスターの数
5	0	0
	25	6.3 ± 2.9
	100	9.8 ± 4.3
	400	7.0 ± 1.8
	1600	0.8 ± 1.0
10	組換え型ヒト正常線維芽 細胞由来HGF (単位/ml)	GMクラスターの数
	0	2.3 ± 3.3
	25	9.8 ± 5.5
	100	20.0 ± 5.5
15	400	15.0 ± 3.6
	1600	15.8 ± 1.3

20

25

1 実施例 12

ヒト胎盤由来肝細胞増殖因子のNFS60細胞増殖刺激活性の測定

5 ヒト胎盤由来肝細胞増殖因子(Becton Dickinson Labware社)と実施例1で精製したヒト正常線維芽細胞由来の天然型肝細胞増殖因子のNFS60細胞増殖刺激活性を実施例6に示した方法で測定した。その結果を第8図に示した。

10 同様にヒト正常肝細胞由来の組換え型肝細胞増殖因子(Nature, Vol. 342, pp. 440-443, November 23, (1989)及びヒト胎児肺の線維芽細胞M426由来の組換え型肝細胞増殖因子(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, pp. 415-419, January, (1991))のNFS60細胞増殖刺激活性も実施
15 例6に示した方法で測定できる。

産業上の利用可能性

20 肝細胞増殖因子は、マウス由来の未分化骨髓芽球細胞の増殖を支持する活性を有する。また、ヒト骨髓細胞及びマウス骨髓細胞を用いた評価系において造血幹細胞の増殖を支持することから、該肝細胞増殖因子を有効成分とする幹細胞増加剤として、骨髓抑制(例えば抗癌剤使用後や骨髓移植後等)に対する治療、骨髓機能不全(例
25 えば再生不良性貧血等)に対する治療、あるいは末梢血幹細胞及び骨髓幹細胞のin vitro増殖の用途に

1 利用することができる。また本発明の造血幹細胞増加剤
 は、結果的には種々の血液細胞ばかりでなく造血幹細胞
 の子孫である破骨細胞の増殖も促進するため、骨粗鬆症
 等の治療剤としての適用も可能である。

5

10

15

20

25

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 16

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Val Val Asn Gly Ile Pro Thr Xaa Thr Asn Ile Gly

1

5

10

Xaa Met Val Lys

15

6 0

配列番号 : 2

配列の長さ : 2 1 7 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : ヒト正常線維芽細胞 (human normal fibroblast)

配列

ATG TGG GTG ACC AAA CTC CTG CCA GCC CTG CTG CTG CAG CAT GTC CTC 48

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu

1 5 10 15

CTG CAT CTC CTC CTG CTC CCC ATC GCC ATC CCC TAT GCA GAG GGA CAA 96

Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln

20 25 30

AGG AAA AGA AGA AAT ACA ATT CAT GAA TTC AAA AAA TCA GCA AAG ACT 144

Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr

35 40 45

ACC CTA ATC AAA ATA GAT CCA GCA CTG AAG ATA AAA ACC AAA AAA GTG 192

Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val

50 55 60

6 1

AAT ACT GCA GAC CAA TGT GCT AAT AGA TGT ACT AGG AAT AAA GGA CTT 240
 Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
 65 70 75 80

CCA TTC ACT TGC AAG GCT TTT GTT TTT GAT AAA GCA AGA AAA CAA TGC 288
 Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
 85 90 95

CTC TGG TTC CCC TTC AAT AGC ATG TCA AGT GGA GTG AAA AAA GAA TTT 336
 Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
 100 105 110

GGC CAT GAA TTT GAC CTC TAT GAA AAC AAA GAC TAC ATT AGA AAC TGC 384
 Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
 115 120 125

ATC ATT GGT AAA GGA CGC AGC TAC AAG GGA ACA GTA TCT ATC ACT AAG 432
 Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
 130 135 140

AGT GGC ATC AAA TGT CAG CCC TGG AGT TCC ATG ATA CCA CAC GAA CAC 480
 Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
 145 150 155 160

AGC TAT CGG GGT AAA GAC CTA CAG GAA AAC TAC TGT CGA AAT CCT CGA 528
 Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg
 165 170 175

6 2

GGG GAA GAA GGG GGA CCC TGG TGT TTC ACA AGC AAT CCA GAG GTA CGC 576
Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg
180 185 190

TAC GAA GTC TGT GAC ATT CCT CAG TGT TCA GAA GTT GAA TGC ATG AOC 624
Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr
195 200 205

TGC AAT GGG GAG AGT TAT CGA GGT CTC ATG GAT CAT ACA GAA TCA GGC 672
Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly
210 215 220

AGG ATT TGT CAG CGC TGG GAT CAT CAG ACA CCA CAC CGG CAC AAA TTC 720
Arg Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe
225 230 235 240

TTG CCT GAA AGA TAT CCC GAC AAG GGC TTT GAT GAT AAT TAT TGC CGC 768
Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg
245 250 255

AAT CCC GAT GGC CAG CCG AGG CCA TGG TGC TAT ACT CTT GAC CCT CAC 816
Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His
260 265 270

ACC CGC TGG GAG TAC TGT GCA ATT AAA ACA TGC GCT GAC AAT ACT ATG 864
Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met
275 280 285

AAT GAC ACT GAT GTT CCT TTG GAA ACA ACT GAA TGC ATC CAA GGT CAA 912
Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln
290 295 300

GGA GAA GGC TAC AGG GGC ACT GTC AAT ACC ATT TGG AAT GGA ATT CCA 960
Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro
305 310 315 320

TGT CAG CGT TGG GAT TCT CAG TAT CCT CAC GAG CAT GAC ATG ACT CCT 1008
Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro
325 330 335

GAA AAT TTC AAG TGC AAG GAC CTA CGA GAA AAT TAC TCC CGA AAT CCA 1056
Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
340 345 350

GAT GGG TCT GAA TCA CCC TGG TGT TTT ACC ACT GAT CCA AAC ATC CGA 1104
Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg
355 360 365

GTT GGC TAC TGC TCC CAA ATT CCA AAC TGT GAT ATG TCA CAT GGA CAA 1152
Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln
370 375 380

GAT TGT TAT CGT GGG AAT GGC AAA AAT TAT ATG GGC AAC TTA TCC CAA 1200
Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln
385 390 395 400

6 4

ACA AGA TCT GGA CTA ACG TGT TCA ATG TGG GAC AAG AAC ATG GAA GAC	1248
Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp	
405 410 415	
TTA CAC CGT CAT ATC TTC TGG GAA CCA GAT GCA ACT AAG CTG AAT GAG	1296
Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu	
420 425 430	
AAT TAC TGC CGA AAT CCA GAT GAT GAT GCT CAT GGA CCC TGG TGC TAC	1344
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr	
435 440 445	
ACG GGA AAT CCA CTC ATT OCT TGG GAT TAT TGC CCT ATT TCT CGT TGT	1392
Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys	
450 455 460	
GAA GGT GAT ACC ACA CCT ACA ATA GTC AAT TTA GAC CAT CCC GTA ATA	1440
Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile	
465 470 475 480	
TCT TGT GCC AAA ACG AAA CAA CTG CGA GTT GTA AAT GGG ATT CCA ACA	1488
Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr	
485 490 495	
CGA ACA AAC GTA GGA TGG ATG GTT AGT TTG AGA TAC AGA AAT AAA CAT	1536
Arg Thr Asn Val Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His	
500 505 510	

6 5

ATC TGC GGA GGA TCA TTG ATA AAG GAG AGT TGG GTT CTT ACT GCA CGA 1584
Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg
515 520 525

CAG TGT TTC CCT TCT CGA GAC TTG AAA GAT TAT GAA GCT TGG CTT GGA 1632
Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly
530 535 540

ATT CAT GAT GTC CAT GGA AGA GGA GAT GAG AAA TGC AAA CAG GTT CTC 1680
Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu
545 550 555 560

AAT GTT TCC CAG CTG GTA TAT GGC CCT GAA GGA TCA GAT CTG GTT TTA 1728
Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu
565 570 575

ATG AAG CTT GCC AGG CCT GCT GTC CTG GAT GAT TTT GTT AGT ACG ATT 1776
Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile
580 585 590

GAT TTA CCT AAT TAT GGA TGC ACA ATT CCT GAA AAG ACC AGT TGC AGT 1824
Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser
595 600 605

GTT TAT GGC TGG GCC TAC ACT GGA TTG ATC AAC TAT GAT GGC CCA TTA 1872
Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Pro Leu
610 615 620

6 6

CGA GTG GCA CAT CTC TAT ATA ATG GGA AAT GAG AAA TGC AGC CAG CAT 1920
Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His
625 630 635 640

CAT CGA GGG AAG GTG ACT CTG AAT GAG TCT GAA ATA TGT GCT GGG GCT 1968
His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala
645 650 655

GAA AAG ATT GGA TCA GGA CCA TGT GAG GGG GAT TAT GGT GGC CCA CTT 2016
Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu 672
660 665 670

GTT TGT GAG CAA CAT AAA ATG AGA ATG GTT CTT GGT GTC ATT GTT OCT 2064
Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro
675 680 685

GGT CGT GGA TGT GCC ATT CCA AAT CGT CCT GGT ATT TTT GTC CGA GTA 2112
Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val
690 695 700

GCA TAT TAT GCA AAA TGG ATA CAC AAA ATT ATT TTA ACA TAT AAG GTA 2160
Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile Leu Thr Tyr Lys Val
705 710 715 720

CCA CAG TCA TAG 2172
Pro Gln Ser ***

1 請 求 の 範 囲

(1) 肝細胞増殖因子類の少なくとも一つを有効成分として含有する造血幹細胞増加剤。

5 (2) 有効成分として更にインターロイキン3及び／またはインターロイキン7を含有する請求の範囲第1項記載の造血幹細胞増加剤。

(3) 骨髓抑制の治療剤としての請求の範囲第1項記載の造血幹細胞増加剤。

10 (4) 骨髓機能不全の治療剤としての請求の範囲第1項記載の造血幹細胞増加剤。

(5) 肝細胞増殖因子が、分子量約60,000である下記N末端アミノ酸配列を有するタンパク質である請求の範囲第1項記載の造血幹細胞増加剤。

15 Val Val Asn Gly Ile Pro Thr Xaa Thr Asn Ile
Gly Xaa Met Val Lys

(式中、Xaaは任意のアミノ酸である)

(6) 肝細胞増殖因子が、表1のアミノ酸組成を有するタンパク質である請求の範囲第5項記載の造血幹細胞増加剤。

20 (7) 肝細胞増殖因子が、ヒト肝細胞由来の組換え肝細胞増殖因子、線維芽細胞由来の組換え肝細胞増殖因子またはヒト胎盤由来肝細胞増殖因子あるいはその同効物である請求の範囲第1項記載の造血幹細胞増加剤。

25 (8) 肝細胞増殖因子が、亜鉛をキレート結合させた担体を用いたクロマトグラフィーにより精製して得られ

1 るものである請求の範囲第 1 項記載の造血幹細胞増加剤
 。

 (9) 担体として更にヘパリンを結合した担体を用い
 ることを特徴とする請求の範囲第 8 項記載の造血幹細胞
5 増加剤。

 (1 0) 肝細胞増殖因子が、配列表の配列番号 2 に示
 したアミノ酸配列を有するタンパク質あるいはその同効
 物である請求の範囲第 1 項記載の造血幹細胞増加剤。

 (1 1) 肝細胞増殖因子類の少なくとも一つの存在下
10 に未分化の骨髄細胞を分化増殖させることを特徴とする
 造血幹細胞増加法。

 (1 2) 多能性造血幹細胞を分化増殖させることを特
 徴とする請求の範囲第 1 1 項記載の方法。

 (1 3) 末梢血幹細胞または骨髄液より得られたヒト
15 骨髄細胞を分化増殖させることを特徴とする請求の範囲
 第 1 1 項記載の方法。

 (1 4) 造血幹細胞増加活性を有し、肝細胞増殖因子
 類に属するタンパク質。

 (1 5) 分子量約 6 0 , 0 0 0 である下記 N 末端アミ
20 ノ酸配列を有するタンパク質である請求の範囲第 1 4 項
 記載のタンパク質。

 Val Val Asn Gly Ile Pro Thr Xaa Thr Asn Ile
 Gly Xaa Met Val Lys

 (式中、Xaa は任意のアミノ酸である)

 (1 6) 表 1 のアミノ酸組成を有するタンパク質であ
25 る請求の範囲第 1 5 項記載のタンパク質。

1 (17) 亜鉛キレート基を結合した担体を用いたクロ
マトグラフィーにより精製して得られるものである請求
の範囲第14項記載のタンパク質。

5 (18) 担体として更にヘパリンを結合した担体を用
いることを特徴とする請求の範囲第17項記載のタンパ
ク質。

 (19) 未分化の骨髓細胞増殖因子であり、肝細胞増
殖因子類の一つである請求の範囲第14項記載のタンバ
ク質。

10 (20) ヒト正常線維芽細胞由来の多能性造血幹細胞
増殖活性を有し、肝細胞増殖因子類の一つであって、組
換えヒト肝細胞増殖因子である請求の範囲第14項記載
のタンパク質。

15 (21) 配列表の配列番号2に示したアミノ酸配列を
有するタンパク質あるいはその同効物である請求の範囲
第14項記載のタンパク質。

20 (22) 該組換えヒト肝細胞増殖因子が、チャイニー
ズハムスター由来CHO細胞またはサル由来COS細胞
中で発現されたものである請求の範囲第21項記載のタ
ンパク質。

 (23) 造血幹細胞増加活性を有し、肝細胞増殖因子
類に属するタンパク質あるいはその同効物のアミノ酸配
列をコードする塩基配列を含むことを特徴とするDNA
。

25 (24) 該アミノ酸配列が配列表の配列番号2に示し
たアミノ酸配列を有するものである請求の範囲第23項

1 記載のDNA。

5 (25) 造血幹細胞増加活性を有し、肝細胞増殖因子類に属するタンパク質あるいはその同効物のアミノ酸配列をコードする塩基配列を発現可能に組み込んでなる組換え発現ベクター。

10 (26) 造血幹細胞増加活性を有し、肝細胞増殖因子類に属するタンパク質あるいはその同効物のアミノ酸配列をコードする塩基配列を発現可能に組み込んでなる組換え発現ベクターにより宿主細胞を形質転換することにより得られた形質転換体。

(27) 該形質転換体が、大腸菌または哺乳類由来細胞である請求の範囲第26項記載の形質転換体。

15 (28) 造血幹細胞増加活性を有し、肝細胞増殖因子類に属するタンパク質あるいはその同効物のアミノ酸配列をコードする塩基配列を発現可能に組み込んでなる組換え発現ベクターによって宿主細胞を形質転換することにより得られた形質転換体を、栄養培地中該タンパク質が発現可能な条件下に培養して、該培養物から造血幹細胞増殖活性を持ち、肝細胞増殖因子類の一つであって、組
20 換えヒト肝細胞増殖因子であるタンパク質を採取することを特徴とする組換えヒト肝細胞増殖因子であるタンパク質の製法。

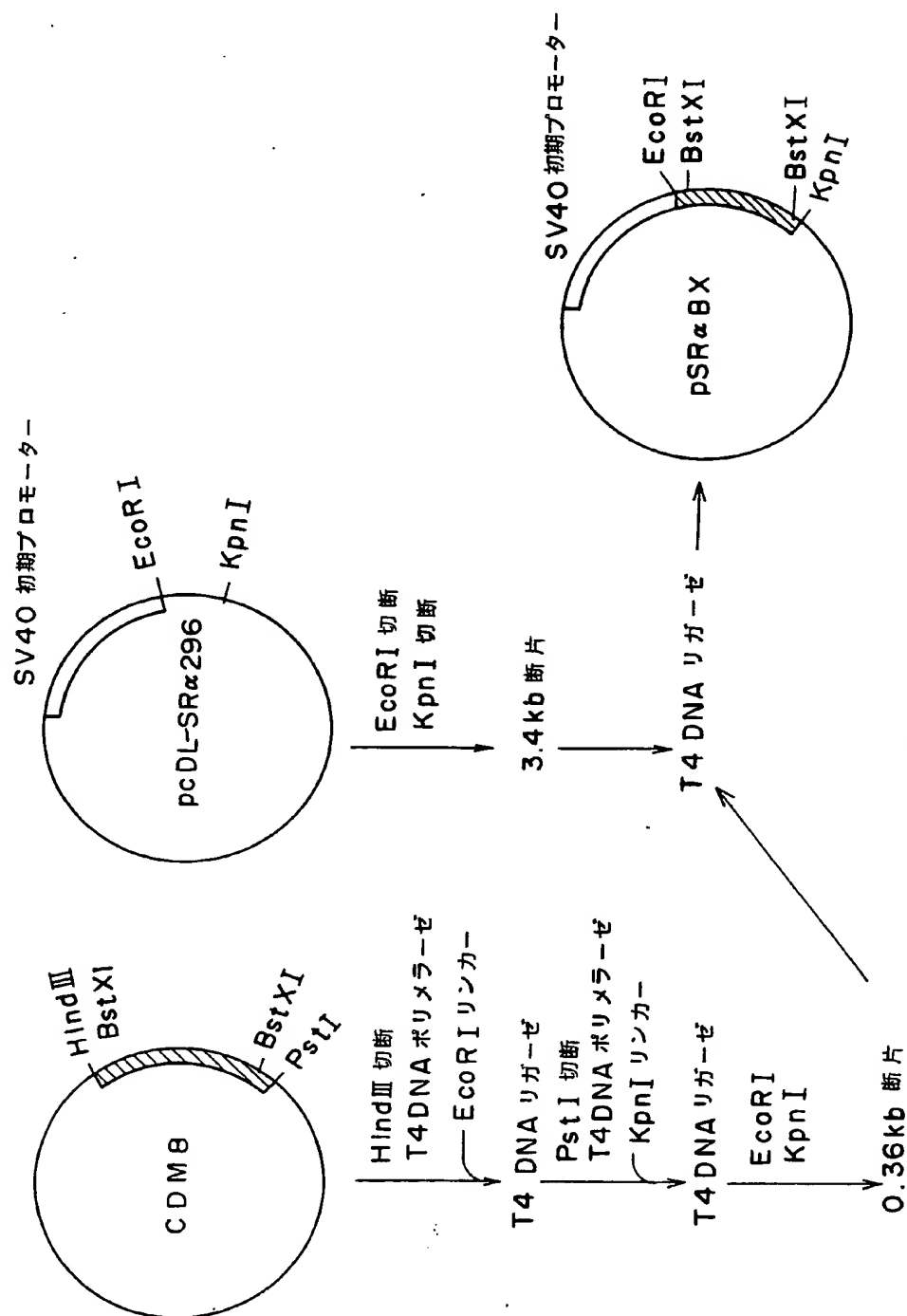


図 1

図 2 (その 1)

ATG TGG GTG ACC AAA CTC CTG CCA GGC CTG CTG CTG CAG CAT GTC CTC	48
Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu	
1 5 10 15	
CTG CAT CTC CTC CTG CTC CCC ATC GGC ATC CCC TAT GCA GAG GGA CAA	96
Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln	
20 25 30	
AGG AAA AGA AGA AAT ACA ATT CAT GAA TTC AAA AAA TCA GCA AAG ACT	144
Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr	
35 40 45	
ACC CTA ATC AAA ATA GAT CCA GCA CTG AAG ATA AAA ACC AAA AAA GTG	192
Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val	
50 55 60	
AAT ACT GCA GAC CAA TGT GCT AAT AGA TGT ACT AGG AAT AAA GGA CTT	240
Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu	
65 70 75 80	
CCA TTC ACT TGC AAG GCT TTT GTT TTT GAT AAA GCA AGA AAA CAA TGC	288
Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys	
85 90 95	
CTC TGG TTC CCC TTC AAT AGC ATG TCA AGT GGA GTG AAA AAA GAA TTT	336
Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe	
100 105 110	
GGC CAT GAA TTT GAC CTC TAT GAA AAC AAA GAC TAC ATT AGA AAC TGC	384
Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys	
115 120 125	
ATC ATT GGT AAA GGA CCC AGC TAC AAG GGA ACA GTA TCT ATC ACT AAG	432
Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys	
130 135 140	

図 2 (その2)

AGT GGC ATC AAA TGT CAG CCG TGG AGT TCC ATG ATA CCA CAC GAA CAC	480
Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His	
145 150 155 160	
AGC TAT CCG GGT AAA GAC CTA CAG GAA AAC TAC TGT CGA AAT CCT CGA	528
Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg	
165 170 175	
GGG GAA GAA GCG GGA CCG TGG TGT TTC ACA AGC AAT CCA GAG GTA CCG	576
Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg	
180 185 190	
TAC GAA GTC TGT GAC ATT CCT CAG TGT TCA GAA GTT GAA TGC ATG ACC	624
Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr	
195 200 205	
TGC AAT GCG GAG AGT TAT CGA GGT CTC ATG GAT CAT ACA GAA TCA CCG	672
Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly	
210 215 220	
AGG ATT TGT CAG CCG TGG GAT CAT CAG ACA CCA CAC CCG CAC AAA TTC	720
Arg Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe	
225 230 235 240	
TTG CCT GAA AGA TAT CCG GAC AAG GCG TTT GAT GAT AAT TAT TGC CCG	768
Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg	
245 250 255	
AAT CCG GAT GCG CAG CCG AGG CCA TGG TGC TAT ACT CTT GAC CCT CAC	816
Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His	
260 265 270	
ACC CCG TGG GAG TAC TGT GCA ATT AAA ACA TGC GCT GAC AAT ACT ATG	864
Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met	
275 280 285	

図 2 (その3)

AAT GAC ACT GAT GTT OCT TTG GAA ACA ACT GAA TGC ATC CAA GGT CAA Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln 290 295 300	912
GGA GAA GGC TAC AGG GGC ACT GTC AAT ACC ATT TGG AAT GGA ATT CCA Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro 305 310 315 320	960
TGT CAG CGT TGG GAT TCT CAG TAT OCT CAC GAG CAT GAC ATG ACT CCT Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro 325 330 335	1008
GAA AAT TTC AAG TGC AAG GAC CTA CGA GAA AAT TAC TGC CGA AAT CCA Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro 340 345 350	1056
GAT GGG TCT GAA TCA CCC TGG TGT TTT ACC ACT GAT CCA AAC ATC CGA Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg 355 360 365	1104
GTT GGC TAC TGC TCC CAA ATT CCA AAC TGT GAT ATG TCA CAT GGA CAA Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln 370 375 380	1152
GAT TGT TAT CGT GGG AAT GGC AAA AAT TAT ATG GGC AAC TTA TCC CAA Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln 385 390 395 400	1200
ACA AGA TCT GGA CTA ACG TGT TCA ATG TGG GAC AAG AAC ATG GAA GAC Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp 405 410 415	1248
TTA CAC CGT CAT ATC TTC TGG GAA CCA GAT GCA AGT AAG CTG AAT GAG Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu 420 425 430	1296

図 2 (その4)

AAT TAC TGC CGA AAT CCA GAT GAT GAT GCT CAT GGA CCC TGG TGC TAC Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr 435 440 445	1344
ACG GGA AAT CCA CTC ATT OCT TGG GAT TAT TGC OCT ATT TCT CGT TGT Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys 450 455 460	1392
GAA GGT GAT ACC ACA CCT ACA ATA GTC AAT TTA GAC CAT CCC GTA ATA Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile 465 470 475 480	1440
TCT TGT GGC AAA ACG AAA CAA CTG CGA GTT GTA AAT GGG ATT CCA ACA Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr 485 490 495	1488
CGA ACA AAC GTA GGA TGG ATG GTT AGT TTG AGA TAC AGA AAT AAA CAT Arg Thr Asn Val Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His 500 505 510	1536
ATC TGC CGA GGA TCA TTG ATA AAG GAG AGT TGG GTT CTT ACT GCA CGA Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg 515 520 525	1584
CAG TGT TTC OCT TCT CGA GAC TTG AAA GAT TAT GAA GCT TGG CTT GGA Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly 530 535 540	1632
ATT CAT GAT GTC CAT GGA AGA GGA GAT GAG AAA TGC AAA CAG GTT CTC Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu 545 550 555 560	1680
AAT GTT TCC CAG CTG GTA TAT GGC CCT GAA GGA TCA GAT CTG GTT TTA Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu 565 570 575	1728

図 2 (その5)

ATG AAG CTT GCC AGG OCT GCT GTC CTG GAT GAT TTT GTT AGT ACG ATT	1776
Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile	
580 585 590	
GAT TTA CCT AAT TAT GGA TGC ACA ATT OCT GAA AAG ACC AGT TGC AGT	1824
Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser	
595 600 605	
GTT TAT GGC TGG GGC TAC ACT GGA TTG ATC AAC TAT GAT GGC CCA TTA	1872
Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Pro Leu	
610 615 620	
CGA GTG GCA CAT CTC TAT ATA ATG GGA AAT GAG AAA TGC AGC CAG CAT	1920
Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His	
625 630 635 640	
CAT CGA GGG AAG GTG ACT CTG AAT GAG TCT GAA ATA TGT GCT GGG GCT	1968
His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala	
645 650 655	
GAA AAG ATT GGA TCA GGA CCA TGT GAG GGG GAT TAT GGT GGC CCA CTT	2016
Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu	672
660 665 670	
GTT TGT GAG CAA CAT AAA ATG AGA ATG GTT CTT GGT GTC ATT GTT OCT	2064
Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro	
675 680 685	
GGT GGT GGA TGT GGC ATT CCA AAT GGT OCT GGT ATT TTT GTC CGA GTA	2112
Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val	
690 695 700	
GCA TAT TAT GCA AAA TGG ATA CAC AAA ATT ATT TTA ACA TAT AAG GTA	2160
Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile Leu Thr Tyr Lys Val	
705 710 715 720	

WO 93/03061

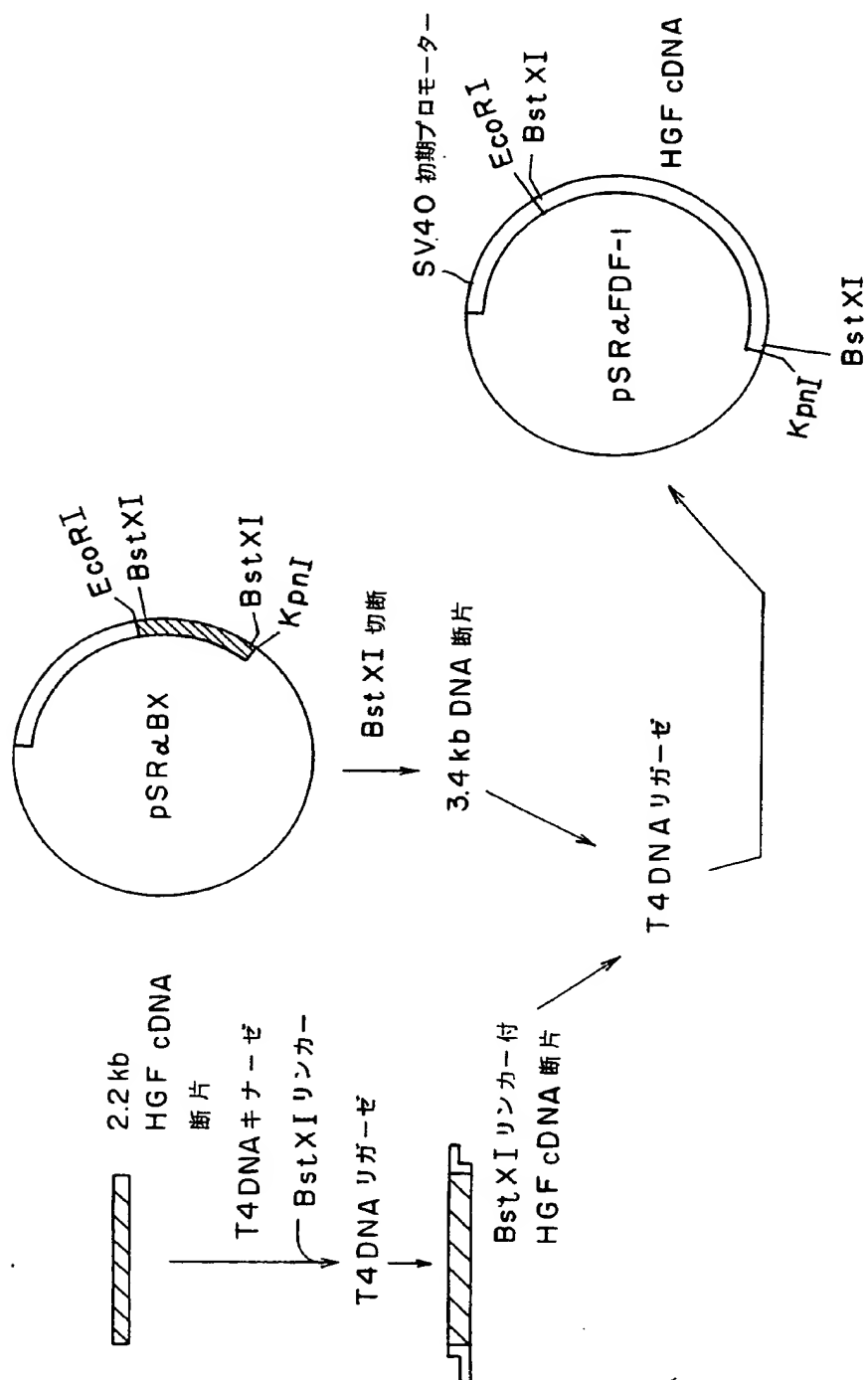
7 / 1 4

PCT/JP92/00949

☒ 2 (その6)

CCA CAG TCA TAG
Pro Gln Ser ***

2172



3

☒

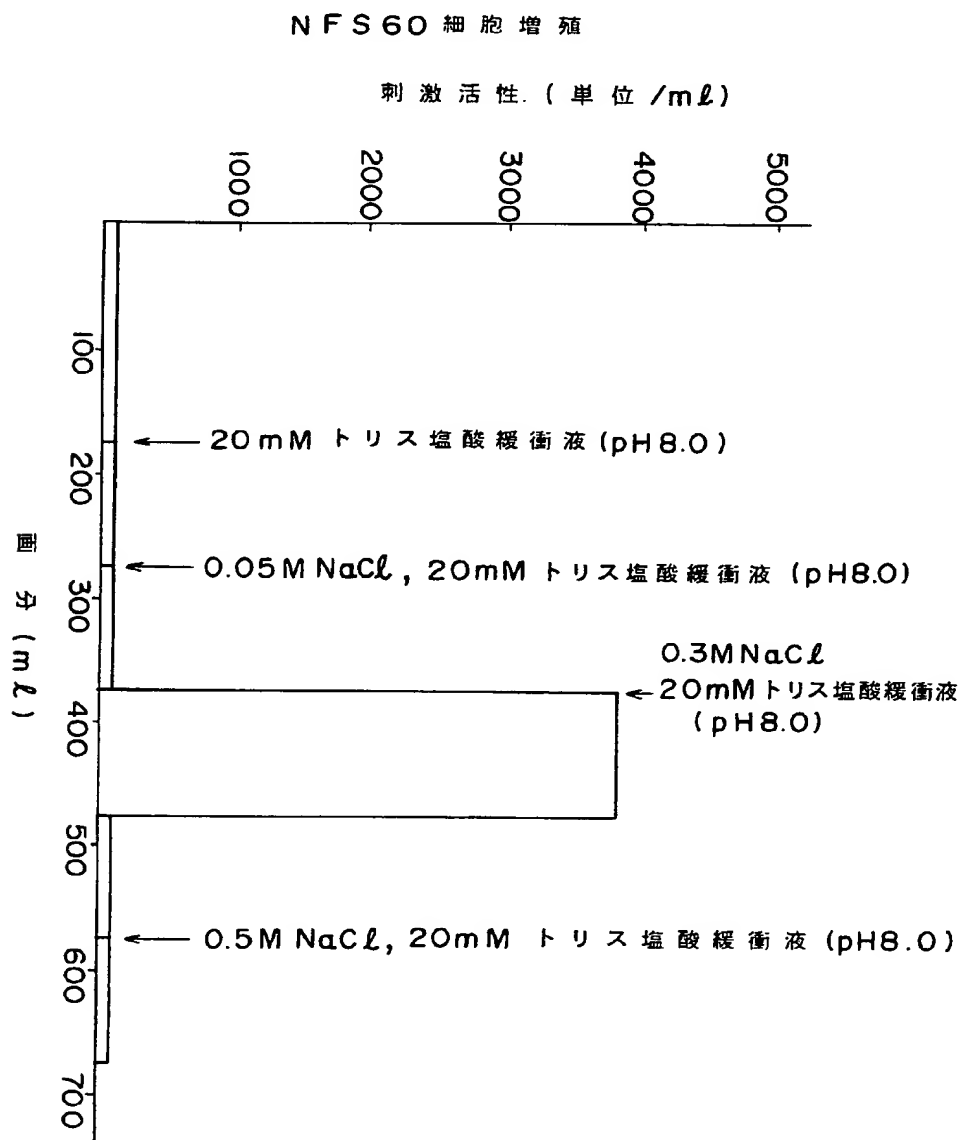
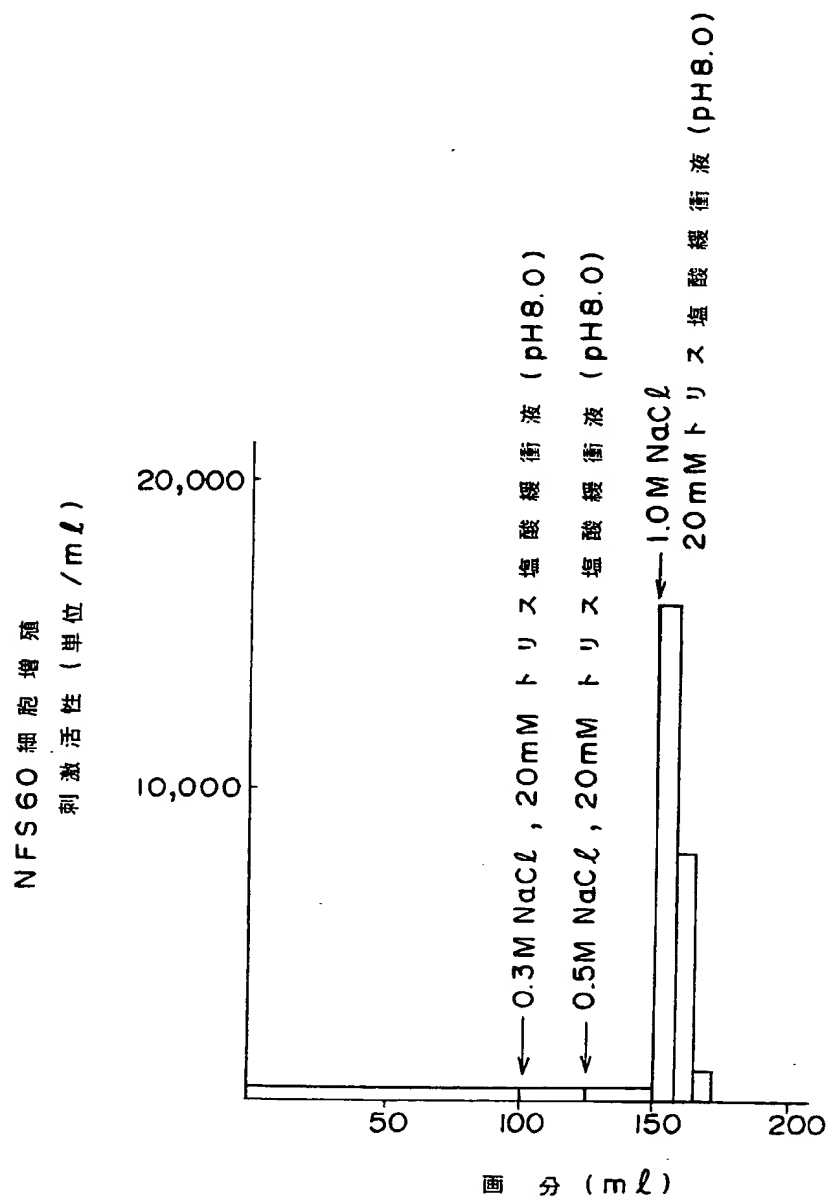


図 4



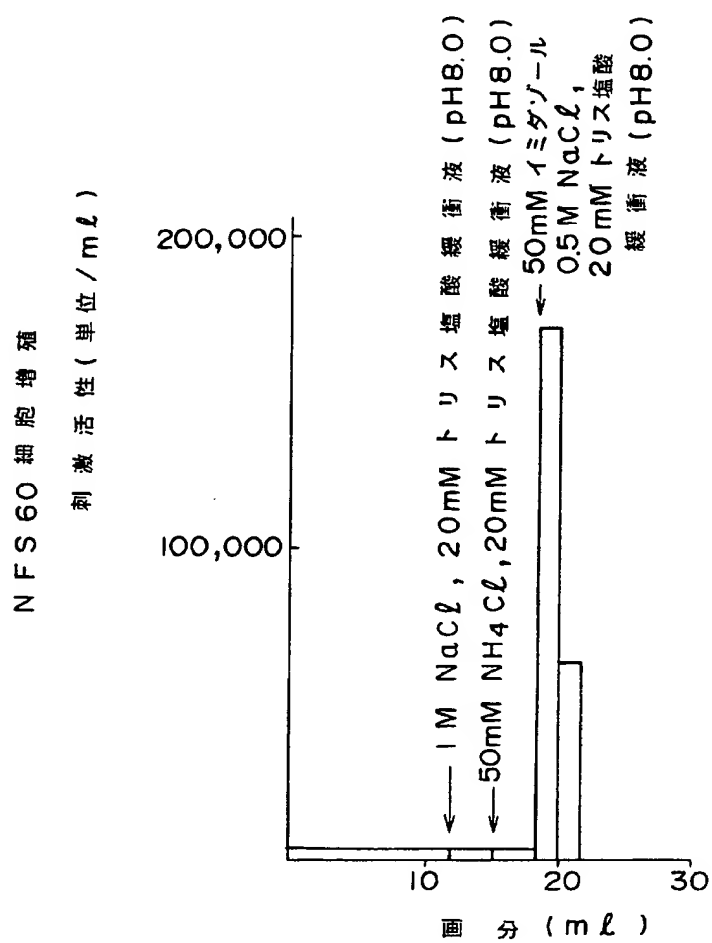


図 6

1 2 / 1 4

分子量マーカー
精製組換え HGF

kDa

97	—	
66	—	■
45	—	
31	—	
21.5	—	
14.4	—	

図 7

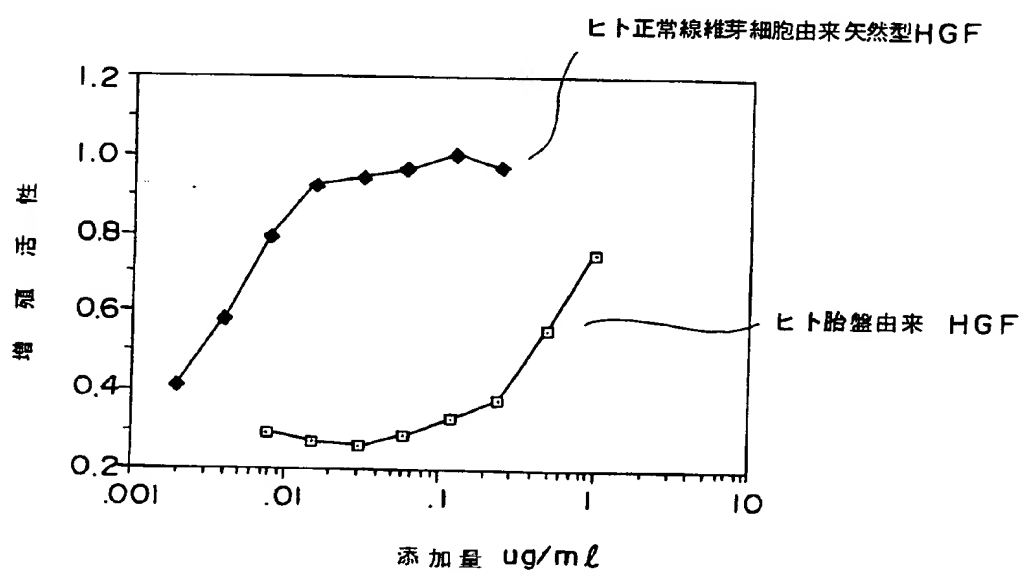


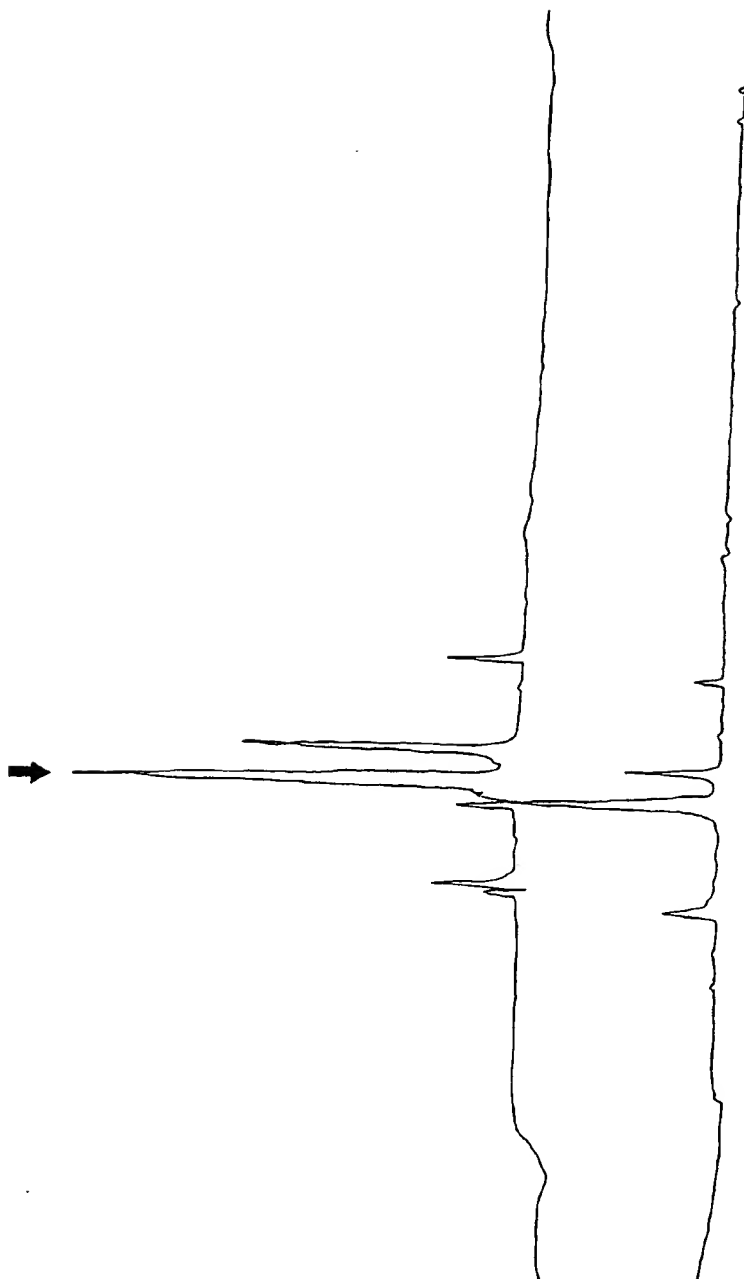
図 8

WO 93/03061

PCT/JP92/00949

1 4 / 1 4

9
☒



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP92/00949

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl ⁵ C07K15/04, C12N15/18, C12P21/02, A61K37/02		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C07K15/04, 15/06, C12N15/12, 15/18, 15/27, C12P21/00, 21/02, A61K37/02	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched ⁸		
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS) Chemical Abstracts Data Base (CA, REGISTRY)		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, Vol. 84, No. 24, (1987), K. Ikebuchi et al., "Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors", p. 9035-9039	1-28
A	Journal of Cellular Physiology, Vol. 112, No. 1, (1982), H-A. Kodama et al., "A new preadipose cell line derived from new born mouse calvaria can promote the proliferation of pluripotent hemopoietic stem cells in-vitro", p. 89-95	1-28
X/A	Nature, Vol. 342, (1989), T. Nakamura et al., "Molecular cloning and expression of human hematocyte growth factor", p. 440-443	14, 17-23, 25-28/1-13, 15, 16, 24
X/A	Biochemical and Biophysical Research	14, 17-22/
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"A" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
October 19, 1992 (19. 10. 92)	November 2, 1992 (02. 11. 92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Japanese Patent Office		

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

Communications, Vol. 122, No. 3, (1984),
T. Nakamura et al.,
"partial purification and characterization
of hepatocyte growth factor from serum of
hepatectomized rats", p. 1450-1459

1-13, 15,
16, 23-28

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers , because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim numbers , because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim numbers , because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ²

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claim numbers:
4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国 際 調 査 報 告

国際出願番号PCT/JP 92/00949

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. ⁸ C07K15/04, C12N15/18, C12P21/02, A61K37/02		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分類体系	分類記号	
IPO	C07K15/04, 15/06, C12N15/12, 15/18, 15/27, C12P21/00, 21/02, A61K37/02	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS) Chemical Abstracts Data Base (CA. REGISTRY)		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 第84巻, 第24号, (1987), K. Ikebuchi et al. "Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemo- poietic progenitors" p. 9035-9039	1-28
A	Journal of Cellular Physiology, 第112巻 第1号, (1982), H-A. Kodama et al. "A new preadipose cell line derived from new born mouse calvaria can pro- mote the proliferation of pluripotent hemopoietic stem cells in-vitro" p. 89-95	1-28
X/A	Nature, 第342巻, (1989), T. NaKamura	14,17-23.
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に関する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の 日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出 願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解 のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新 規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の 文献との、当業者にとって自明である組合せによって進 歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 証 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
19. 10. 92	02.11.92	
国際調査機関	権限のある職員	4 B 8 2 1 4
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	内 田 俊 生

第2ページから続く情報

(重欄の続き)

	et al. "Molecular cloning and expression of human hematocyte growth factor" p. 440-443	25-28/1-13 15,16,24
X/A	Biochemical and Biophysical Research Communications, 第122巻, 第3号, (1984), T. NaKamura et al. "partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats" p. 1450-1459	14,17-22/1-13,15,16,23-28

V. 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. 請求の範囲 _____ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲でありかつ PCT 規則 6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI. 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

六に述べるとこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲 _____
3. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲 _____
4. 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。
追加手数料異議の申立てに関する注意
_____ 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがなされた。
_____ 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。